

Ana Raquel Martins Barbosa

**Contribuição para a Caracterização dos
Mecanismos de Resistência aos antibióticos
 β -lactâmicos em estirpes de *Haemophilus
influenzae*, isoladas em Portugal**

LISBOA

2009

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Ana Raquel Martins Barbosa

**Contribuição para a Caracterização dos
Mecanismos de Resistência aos antibióticos
 β -Lactâmicos em estirpes de *Haemophilus
influenzae*, isoladas em Portugal**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientador:

Doutora Maria Paula Bajanca Lavado (INSA)

Co-orientador:

Prof^a. Doutora Ana Madalena Ludovice (FCT/UNL)

LISBOA

2009

Publicações no âmbito deste trabalho:

Barbosa, A. R., Bajanca, M. P. “Caracterização do mecanismo de resistência não enzimático à ampicilina em estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas em Portugal”. Comunicação oral apresentada no I congresso Nacional de Saúde Pública. Abril 2009.

Barbosa, A. R., Bajanca, M. P. "Infecções por *Haemophilus influenzae* em idade pediátrica: Caracterização dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos". Comunicação oral apresentada no X Congresso Nacional de Pediatria, Outubro 2009.

Barbosa, A. R., Giufrè, M., Cerquetti, M., & Bajanca-Lavado, P. 2009. Association of amino acid substitutions in PBP3 with beta-lactam resistance in *Haemophilus influenzae* with reduced susceptibility to ampicillin in Portugal (in preparation).

Aos meus Pais e Mano.

Agradecimentos

Ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em Lisboa, na pessoa do seu director, Doutor José Pereira Miguel, agradeço ter-me permitido realizar na Unidade de Resistência aos antibióticos e no Laboratório de Referência de Infecções Respiratórias, a totalidade do trabalho experimental apresentado nesta dissertação.

À Doutora Manuela Caniça, responsável pela Unidade de Resistência aos Antibióticos, por me ter recebido no seu Laboratório e por todo o apoio prestado.

À minha orientadora, Doutora Paula Bajanca Lavado, pelos seus valiosos ensinamentos, constante dedicação, disponibilidade, motivação e por todo o carinho com que me recebeu.

À Professora Doutora Ana Madalena Ludovice por acreditar no meu projecto e ajuda na sua conclusão.

À Célia por toda a disponibilidade, ajuda e amizade.

A todo o pessoal da Unidade de Resistência aos Antibióticos. Dr.^a Eugénia Ferreira e D. Deolinda, por todo o apoio e ensinamentos e por me fazerem sentir em casa. Aos mais novos, Nuno, Ricardo, David, Germana, Vera e Daniela, pelo companheirismo, brincadeiras constantes mas também por tudo o que me ensinaram. À Vera em especial pela disponibilidade e paciência para as minhas dúvidas de *BioNumerics*.

Às minhas “Siamesas” pela cumplicidade e amizade, e entreaajuda ao longo de todos estes anos de formação académica. Sem vocês não tinha tido piada.

A todos os meus amigos que directa ou indirectamente contribuíram para o que sou hoje.

Ao Mário por tudo o que me ensinou, pelo apoio, pelo carinho e por ter acreditado em mim.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pela compreensão, carinho e todo o amor que me deram. Por todas as lições de vida e pela liberdade para aprender com os meus erros e teimosia. Obrigado por estarem sempre presentes.

Ao meu mano por todo o companheirismo, cumplicidade e apoio. Apesar das turras (que foram muitas) só nós sabemos como nos adoramos! Estás sempre lá...

Ao Fábio por todo o apoio, ensinamentos, amor, carinho e paciência (sim, sei que foi preciso muita paciência!). Por estares aqui agora e para sempre. Fazes-me acreditar que os sonhos podem tornar-se realidade.

Resumo

A gravidade das infecções a *Haemophilus influenzae* e a necessidade de se actuar com rapidez têm levado ao estabelecimento de uma terapia antimicrobiana empírica. No entanto, a emergência de estirpes resistentes como resultado da pressão selectiva é, hoje em dia, uma realidade preocupante. Nesta espécie, a resistência a alguns β -lactâmicos, como é o caso da ampicilina, é essencialmente caracterizada por dois mecanismos: a produção de enzima β -lactamase e a presença de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) alteradas. Com o objectivo de caracterizar o mecanismo de resistência a estes antibióticos no nosso país, foi escolhida uma amostra de 240 estirpes clínicas de *H. influenzae*, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM) à ampicilina. Assim, estudámos 100 estirpes com CIM à ampicilina entre 1 e 8 $\mu\text{g/ml}$, 80 estirpes com CIM $>8 \mu\text{g/ml}$ e ainda um grupo controlo de 60 estirpes susceptíveis com CIM entre 0,12 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$. A sequência do gene *ftsI*, que codifica o domínio da transpeptidase da PBP3, foi determinada para todas as estirpes. Das 240 estirpes, 141 apresentavam mutações perto das zonas conservadas do gene *ftsI* originando 31 padrões mutacionais. A análise dos padrões mutacionais permitiu classificar a maioria destas estirpes (96,5%) no grupo mutacional II (Ubukata *et al.*, 2001) caracterizado pela substituição Asn526Lys. Para além da substituição referida (Asn526Lys) foram ainda caracterizadas com maior frequência as substituições Val547Ile (88%) e Asn569Ser (73%). A relação entre as mutações encontradas e o nível de susceptibilidade à ampicilina permitiu observar que 27,5% das estirpes eram susceptíveis, 13,8% eram resistentes por produção de β -lactamase (BLPAR), 39,1% era resistente sem produção de β -lactamase (BLNAR) e 19,6% apresentavam ambos os mecanismos de resistência (BLPACR). Apesar de o CLSI categorizar como susceptíveis as estirpes com CIM de 1 $\mu\text{g/ml}$ e como intermédias as de 2 $\mu\text{g/ml}$, 97,3% destas estirpes apresentavam mutações junto das zonas conservadas do domínio da transpeptidase no gene *ftsI*, indicando a existência do mecanismo de resistência não enzimático. Utilizando a técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), que analisa a diversidade genética das estirpes, verificámos a existência de uma elevada diversidade entre as estirpes BLNAR. Pelo contrário, as estirpes BLPACR estão, na maior parte dos casos, geneticamente relacionadas entre si. Estudos desta natureza são importantes para a definição de novos *breakpoints* para os antibióticos β -lactâmicos, em *H. influenzae*. Poderiam, assim, ser evitadas muitas falências terapêuticas o que representaria elevados ganhos em Saúde Pública.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Índice	iii
Abreviaturas	vii
Introdução	1
Género <i>Haemophilus</i>	1
Patogenicidade.....	2
Vacinas	3
Antibióticos	5
B-lactâmicos	6
1. Penicilinas.....	9
2. Cefalosporinas	9
3. Carbapenemes (Imipinem, Meropenem)	10
4. Inibidores de β -lactamases.....	11
Susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos.....	11
1. Mecanismo de resistência enzimático em <i>Haemophilus influenzae</i> – Produção de β -lactamase.....	13
2. Mecanismo de resistência não enzimático à ampicilina em <i>Haemophilus influenzae</i>	14
3. Resistência combinada	17
Materiais e Métodos	19
Estirpes bacterianas	19
Determinação da produção de β -lactamases por teste cromogénio.....	20
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	20
1. Método de microdiluição em placa.....	20
2. Método de diluição em meio sólido (agar)	22

Extracção de DNA	22
Identificação de <i>H. influenzae</i> por PCR – amplificação do gene P6.....	22
Determinação da presença de cápsula em estirpes de <i>H. influenzae</i>	23
1. Identificação da presença de cápsula por amplificação de um fragmento interno do gene <i>bexA</i> por PCR	23
2. Identificação dos serótipos por testes serológicos	24
3. Determinação do Serótipo por PCR.....	25
Detecção dos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos por PCR.....	25
1. Detecção do gene <i>ftsI</i>	25
2. Detecção de fragmentos dos genes responsáveis pela produção de β -lactamases	26
3. Detecção dos genes responsáveis pela produção de β -lactamases por PCR Multiplex	27
Purificação do produto de PCR	27
Sequenciação do gene <i>ftsI</i>	28
Electroforese em campo pulsado (PFGE).....	29
Resultados	33
Características das estirpes de <i>H. influenzae</i>	33
Susceptibilidade aos antibióticos	33
Pesquisa e caracterização da cápsula	35
Detecção dos genes responsáveis pela produção de β -lactamases.....	36
Amplificação do gene <i>ftsI</i> que codifica a PBP3.....	37
Sequenciação do gene <i>ftsI</i>	37
Relação entre os fenótipos de susceptibilidade aos β -lactâmicos e os genótipos de resistência.....	42
Análise dos padrões de macrorestrição de <i>SmaI</i> por PFGE.....	46
Discussão	55

Susceptibilidade aos antibióticos	55
Cápsula	56
Genes responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos	57
1. Resistência mediada pela produção de β -lactamase	57
2. Resistência mediada por alterações nas PBP3	58
Relação entre os fenótipos de susceptibilidade aos β -lactâmicos e os genótipos de resistência.	61
Disseminação clonal	64
Bibliografia	67
Anexos	77

Abreviaturas

Alguns termos técnicos com origem na língua inglesa são utilizados no decorrer do texto desta tese, não tendo sido traduzidos visto fazerem parte de um glossário científico estabelecido na literatura internacional.

BLNAR – estirpes resistentes à ampicilina, não produtoras de β -lactamases

BLPACR- estirpes produtoras de β -lactamases resistentes à amoxicilina-clavulanato

BLPAR – estirpes resistentes à ampicilina produtoras de β -lactamase

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ESBLs – β -lactamases de largo espectro

Hib – *Haemophilus influenzae* serótipo b

HTM - *Haemophilus* Test Medium

LPS – lipopolissacarídeos

NAD – Nicotinamida adenina dinucleótido

NC – estirpes não capsulada

pb - par de bases

PFGE- *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

PBPs – *Penicillin binding proteins* (proteínas de ligação à penicilina)

PCR – *polimerase chain reaction* (*reacção* em cadeia da polimerase)

PNV – Plano Nacional de Vacinação

SXT – Trimetropim-sulfatometaxazol

TAE – Tris-acetato EDTA

TBE- Tris-borato EDTA

Aminoácidos - Abreviaturas dos aminoácidos são apresentadas no **anexo II**, pagina 78

Introdução

Género Haemophilus

O género *Haemophilus* pertence à família *Pasteurellaceae* e inclui diversas espécies que têm em comum a necessidade de factores derivados do sangue para o seu crescimento (Peake *et al.*, 1996). Durante a pandemia de gripe de 1890, *Richard Pfeiffer* isolou das secreções brônquicas da maior parte dos doentes um pequeno bacilo Gram-negativo, capsulado, que exigia para o seu crescimento meios enriquecidos em sangue. O sistemático isolamento deste microrganismo, em doentes com gripe, levou Pfeiffer a pensar que estava perante o agente responsável por esta doença, tendo-o designado por “*Bacillus influenzae*”. O facto de os bacilos isolados por *Pfeiffer* necessitarem para o seu crescimento de factores existentes no sangue, levou a que se designassem por *Hemophilus* (do Grego *haima* - sangue, *philos* - amigos) (Kilian e Biberstein, 1984) e o nome foi alterado em 1920, para *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) por *Winslow* e colaboradores (revisto em Zinnemann, 1981). Em 1933, com o isolamento de um vírus designado por *Myxovirus influenzae* e identificação deste como o agente etiológico da gripe, foi posta em causa a importância do *H. influenzae* na pandemia de 1890. Verificou-se mais tarde que esta espécie era um agente patogénico secundário que provocava infecções bacterianas em doentes debilitados por infecções virais (Murphy, 1992; Atkinson *et al.*, 2008).

Este género é caracterizado por pequenos bacilos Gram-negativos (**figura 1**), aeróbios (podendo crescer como anaeróbios facultativos), pleomórficos, e com uma temperatura ideal de crescimento entre os 35°C e os 37°C (Murray, 2002). A estrutura da parede celular das espécies do género *Haemophilus* é típica dos bacilos Gram-negativos, apresentando lipopolissacáridos (LPS) com actividade de endotoxina, fosfolípidos, proteínas específicas de espécie e específicas de estirpe. Em *H. influenzae* estes lipopolissacáridos caracterizam-se por possuir cadeias polissacarídicas bastante curtas, designadas de lipooligossacarídeos (Erwin e Smith, 2007).

H. influenzae está presente nas membranas mucosas de cerca de 75% de crianças e indivíduos adultos saudáveis, sendo um importante agente patogénico do Homem (Todar, 2008).

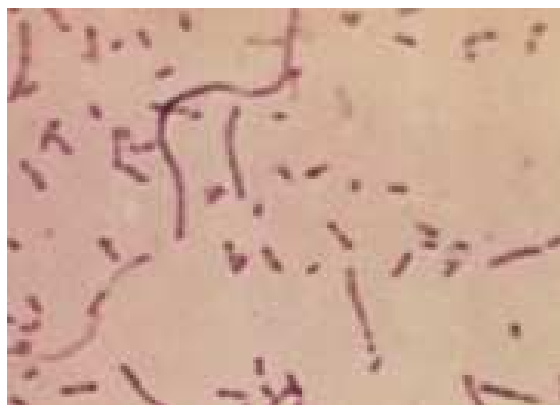


Figura. 1- Coloração de Gram de *Haemophilus influenzae*.

(<http://www.textbookofbacteriology.net/haemophilus.html>)

Patogenicidade

Entre as diversas espécies de *Haemophilus*, *H. influenzae* é, claramente, o mais importante agente patogénico do homem sendo responsável por uma variedade de infecções em crianças e adultos, que vão desde as infecções do tracto respiratório até infecções invasivas, como meningite, septicémia, epiglottite, celulite ou mesmo artrite séptica (Arnold *et al.*, 1993; de Lencastre *et al.*, 1999). Estas infecções podem ser de dois tipos: infecções agudas e habitualmente invasivas, nas quais o *H. influenzae* é, certamente, a causa primária, ou infecções crónicas, onde o *H. influenzae* parece ter uma função secundária.

Um dos factores de virulência mais estudado em *H. influenzae* e que está envolvido na patogenicidade de uma determinada estirpe é a **cápsula** (Moxon, 1993). Este facto foi demonstrado por Pittman, em 1931, ao verificar que as estirpes responsáveis por infecções invasivas, ao contrário da maior parte das estirpes isoladas de pessoas saudáveis, possuíam cápsula (revisto em Kilian e Frederiksen, 1981). Pittman classificou as formas capsuladas de *H. influenzae* em seis tipos, antigénica e quimicamente distintos, que designou de **a** a **f** (revisto em Peake, *et al.*, 1996). Os seis tipos diferem na estrutura química dos seus polissacáridos capsulares e são identificados com antisoros específicos, através de uma reacção de aglutinação.

A cápsula das estirpes de serótipo b, considerada como um dos principais determinantes da sua virulência, é composta por fosfato de poli-ribosil-ribitol-PRP (polímero de unidades alternadas de ribose e ribitol). Turk (1984) relatou diversas experiências que

evidenciaram a importância do PRP, na virulência de *H. influenzae*, facilitando a colonização e invasão em hospedeiros sensíveis e provocando infecções localizadas.

Em relação aos outros serótipos (**a**, **c**, **d**, **e**, **f**) a sua virulência foi comparada em ratinhos, tendo-se verificado que os serótipos **c**, **d** e **e** não desenvolviam bacteriemia e meningite, enquanto os serótipos **a** e **f** podiam desenvolver bacteriemia, de um modo pouco frequente e, normalmente, em hospedeiros pouco saudáveis (Turk & May, 1967).

Apesar de quase todas as estirpes de *H. influenzae* associadas a infecção invasiva possuírem uma cápsula, nas estirpes não capsuladas (NC) já foram caracterizados vários processos biológicos e identificadas diversas estruturas da superfície celular que parecem estar envolvidas na virulência. Contudo, as estirpes NC são genética e fenotipicamente diversas e, alguns dos genes que codificam estes determinantes de virulência não estão presentes em todos os isolados que causam infecção invasiva, indicando que estas estirpes podem variar nos seus mecanismos de patogenicidade (Peake *et al.*, 1996; Evans e Brachman, 1998; Erwin e Smith., 2007). A interacção inicial entre as estirpes NC e a célula do hospedeiro ocorre aquando da aderência (por fímbrias, proteínas da membrana externa) da célula bacteriana ao muco ou às células do tracto respiratório superior, sendo este um dos processos mais cruciais para a virulência. Os passos subsequentes podem incluir invasão das células do epitélio respiratório, formação de microcolónias e consequentemente a formação de biofilmes (Erwin e Smith, 2007).

Vacinas

Nos finais dos anos sessenta iniciaram-se, nos Estados Unidos da América, estudos que levaram ao desenvolvimento de uma vacina para a prevenção de infecções provocadas por *H. influenzae*, sendo os primeiros trabalhos realizados nesta área dirigidos às estirpes de *H. influenzae* do serótipo b (Hib). Em Abril de 1985 a “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou a primeira vacina para o Hib baseando-se num “trial” efectuado na Finlândia, em que se obteve uma eficácia de 92% para uma amostragem de 100 mil crianças (Peltola *et al.*, 1977). Porém, diversos estudos apresentaram falências a esta vacina, principalmente em crianças com idade inferior a 2 anos, onde se detectaram níveis de anticorpos muito baixos (Ginsburg *et al.*, 1977; Granoff *et al.*, 1986; Kessler *et al.*, 1993). Em 1990, a FDA aprovou uma nova geração de vacinas adequadas para serem administradas a lactentes (a partir dos 2

meses de idade). Nestas vacinas o PRP encontra-se conjugado a uma proteína transportadora, nomeadamente à toxina do tétano ou da difteria, ou a uma proteína de membrana de *Neisseria meningitidis* (OMP), havendo evidência de que o polissacárido, quando acoplado a uma proteína transportadora, se torna mais imunogénico (Groz-Dias, 1997).

Em Portugal a vacina conjugada para a prevenção de doenças provocadas por Hib está disponível desde 1994, tendo sido aconselhada por muitos pediatras, para crianças com menos de 5 anos de idade. No ano 2000 a vacina foi incluída no Programa Nacional de Vacinação.

A epidemiologia da infecção provocada por *H. influenzae* mudou drasticamente nos últimos anos, devido à introdução da vacina conjugada. Antes da sua introdução, estimavam-se, anualmente, 20000 casos de doença invasiva por Hib em crianças com menos de 5 anos, nos países desenvolvidos. Após a introdução desta vacina a incidência diminuiu cerca de 95% e actualmente, a maioria das infecções por este serótipo ocorre, essencialmente, em crianças não imunizadas ou idosos com baixa imunidade (Tristram *et al.*, 2007). Apesar do sucesso da vacina conjugada, o problema das infecções por *H. influenzae* não está resolvido, uma vez que têm sido referidas infecções graves provocadas por estirpes de outros serótipos (**a**, **e** e **f**) e ainda a emergência de estirpes NC (Peake *et al.*, 1996; Murray, 2002; Campos *et al.*, 2004; Bajanca, 2004; Atkinson *et al.*, 2008). Em concordância com o observado noutros países, também em Portugal se verificou uma diminuição significativa da infecção invasiva por Hib (de 68,2% entre 1989 e 2000 para 12,6% entre 2001 e 2008), assim como um aumento das estirpes NC (de 31,8% entre 1989 e 2000 para 76,6% entre 2001 e 2008) (dados não publicados). As estirpes NC são responsáveis por infecções como otite média aguda, sinusite, bronquite crónica e outras infecções respiratórias. Com a identificação de uma proteína (proteína D) altamente conservada nas estirpes de *H. influenzae*, incluindo as NC, envolvida na virulência destas estirpes (Forsgren *et al.*, 2008) foi possível o desenvolvimento de ensaios clínicos de uma vacina conjugada com 11 serótipos de *Streptococcus pneumoniae* e a proteína D derivada de *H. influenzae* (PCV11-HiD) (Prymula, *et al.*, 2006; Pelton, 2007; Forsgren *et al.*, 2008; De Wals *et al.*, 2009). Num estudo efectuado em 2006 com 4968 crianças com menos de 2 anos de idade às quais foi administrada a vacina conjugada PCV11-HiD, ou a vacina para a hepatite A (controlo) foi possível observar 35,6% de protecção contra otite média aguda provocada por *H. influenzae* (Prymula *et al.*, 2006). Estes resultados vieram confirmar a produção de anticorpos, induzida pela proteína D, contras as estirpes de *H. influenzae*. Em Portugal, muito recentemente, foi posta no mercado uma vacina conjugada

com 10 serótipos de *S. pneumoniae* conjugados com a proteína D de *H. influenzae*, indicada para a prevenção de otites em crianças. Outros ensaios têm sido realizados nos últimos anos com resultados muito idênticos (Pelton, 2007; Forsgren *et al.*, 2008; de Wals *et al.*, 2009). Reconhecendo a importância das estirpes de *H. influenzae* NC como agentes responsáveis por infecções diversas e muitas vezes graves, do tracto respiratório inferior, estes dados criam perspectivas interessantes para o melhor controlo desta infecção. (Prymula *et al.*, 2006).

Antibióticos

A terapia antimicrobiana remonta a mais de dois mil e quinhentos anos, quando os chineses e os egípcios utilizavam mel e plantas diversas para o tratamento de infecções localizadas. No entanto, foi a descoberta da penicilina em 1929, das sulfamidas em 1932, e a sua aplicação no tratamento de infecções bacterianas nas décadas de trinta e quarenta, que podem ser consideradas como o verdadeiro início da terapia antimicrobiana moderna e que conduziu ao desenvolvimento da indústria farmacêutica neste campo (Shungu, 1991).

Os antibióticos são substâncias químicas que provocam a morte ou a inibição do crescimento de microrganismos. Podem ser de origem natural ou de origem sintética (total ou parcial). Os antibióticos diferem, essencialmente, nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e, ainda, no mecanismo de acção. Por esta razão os critérios adoptados para a classificação dos antibióticos são diversos, não havendo consenso para uma classificação geral. Uma das classificações mais comuns divide os antibióticos em 9 classes: os β -lactâmicos (por exemplo: penicilinas, cefalosporinas), aminoglicosídeos (gentamicina), quinolonas (ciprofloxacina) tetraciclina (tetraciclina), macrólidos (eritromicina, azitromicina), glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina) sulfonamidas (trimetoprim-Sulfametoxazol), lincomicina (clindamicina) e os oxazolidinonas (linezolide). Existem, ainda, outros antibióticos que não pertencem a nenhuma destas classes como por exemplo a rifampicina.

β -lactâmicos

A classe dos β -lactâmicos é composta por uma grande variedade de antibióticos, incluindo as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenemes e os monobactâmicos. Todos os elementos deste grupo apresentam em comum um anel β -lactâmico, constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio com diferentes radicais. A distinção entre os principais constituintes deste grupo é, assim, feita de acordo com a sua estrutura química, podendo apresentar: um único anel β -lactâmico (monobactâmicos), um anel β -lactâmico fundido a um anel tiazolidina (penicilinas e carbapenemes) ou fundido a um anel di-hidrotiazina (cefalosporinas) (Vaz Pato, 1989; Sousa *et al.*, 1998). Estes antibióticos actuam apenas na fase de crescimento da cultura bacteriana, ou seja, na fase de síntese da parede celular e são, na sua maioria, bactericidas. O seu mecanismo de acção é influenciado pelo estado do sistema autolítico, pela velocidade de crescimento e pelo estado de nutrição da bactéria. Pode ainda depender da permeabilidade do antibiótico para a célula bacteriana, da afinidade para as proteínas de ligação à penicilina e da vulnerabilidade aos diversos mecanismos de resistência das bactérias (Bryan e Godfrey, 1991; Sousa *et al.*, 1998; Wilke *et al.*, 2005).

Os alvos dos β -lactâmicos são as proteínas da membrana bacteriana designadas por **proteínas de ligação à penicilina (PBPs)**, essenciais para a síntese de peptidoglicano, constituinte da parede celular das bactérias (Fluit *et al.*, 2001). O peptidoglicano é uma macromolécula única que reveste a célula bacteriana e que integra diversas funções tais como, a definição da forma celular, a ligação de factores de virulência e adesinas e a indução de modificações celulares em resposta a diferentes factores de stress (Macheboeuf *et al.*, 2006). Nas estirpes Gram-positivas o peptidoglicano é produzido em diversas camadas, enquanto nas espécies Gram-negativas, como é o caso do *H. influenzae*, este apresenta-se sob a forma de uma única camada fina (**figura 2**).

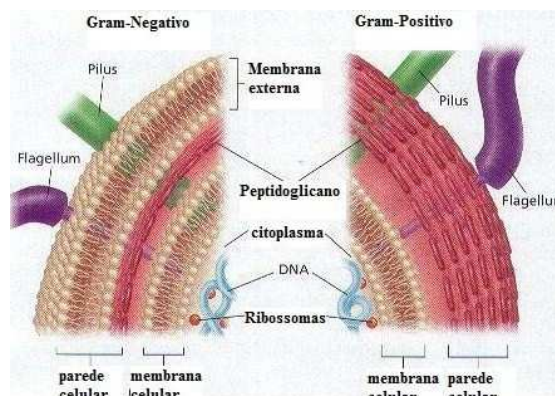


Figura 2 – Representação esquemática da parede celular de espécies Gram-negativas e Gram-positivas. Nas espécies Gram-negativas a parede celular é constituída por uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa. Já nas espécies Gram-positivas, não existe uma membrana externa mas o peptidoglicano da parede celular é constituído por diversas camadas.

(adaptado de http://www.biologycorner.com/resources/gram_bacteria.jpg)

O peptidoglicano é constituído por monómeros de cadeias polissacarídicas alternadas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e N-acetil murâmico (MurNAc), que estão ligados entre si através de um péptido. A síntese do peptidoglicano é iniciada no citoplasma com a acção de seis enzimas Mur (MurA até MurF) que catalisam a formação de uma molécula uril-difosfatada de N-acetil murâmico (UDP-MurNAc) a partir de uma molécula precursora de UDP-GlcNAc e que, subsequentemente, adicionam um péptido com cinco aminoácidos ao monómero. Esta sequência pentapeptídica pode variar de espécie para espécie, terminando geralmente com uma ligação D-alanina, D-alanina (Macheboeuf *et al.*, 2006). Em *H. influenzae* este péptido é constituído por L-alanina, D-glutamato, ácido meso-diaminopimélico e D-alanil-D-alanina (revisto em Alaedini e Day, 1999). Através da acção da enzima MraY esta molécula solúvel (UDP-MurNAc-pentapéptido) liga-se a um fosfolípido transportador, que ao apresentar um grupo difosfato embebido na membrana lhe permite a sua associação. Esta nova molécula designa-se por lípido I. Através da acção da enzima MurG, ao lípido I é adicionado um grupo solúvel de UDP-GlcNAc, dando-se a síntese do lípido II. Esta molécula é o precursor da biossíntese do peptidoglicano e o substrato das PBPs. Nesta fase do processo de formação do peptidoglicano o lípido II ainda se encontra no citoplasma bacteriano, sendo essencial a sua passagem para o exterior da célula, de forma a finalizar a formação da macromolécula. Uma vez no exterior da membrana celular, o lípido II é

polimerizado e o pentapéptido é incorporado na camada de peptidoglicano em formação, através da acção das PBPs (**figura. 3**) (Macheboeuf *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2008).

As PBPs estão localizadas no folheto exterior da membrana citoplasmática e podem participar em três reacções específicas: a síntese de cadeias de glicano por transglicosilação; a ligação cruzada dos péptidos do peptidoglicano por transpeptidação e a clivagem dos resíduos terminais da cadeia peptídica D-alanil-D-alanina através da actividade de DD-carboxipeptidase. O número e tipo de PBPs varia consoante a espécie e estão classificadas de acordo com o número de reacções, anteriormente descritas, que uma única enzima pode executar. Assim, temos as PBPs bi-funcionais (classe A) que podem realizar mais do que uma reacção e as PBPs uni-funcionais (classe B) que catalisam apenas uma das reacções (Macheboeuf *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2008).

O anel dos antibióticos β -lactâmicos possui uma estrutura muito semelhante ao substrato natural das PBPs, D-alanil-D-alanina, o que permite que se ligue covalentemente ao centro catalítico destas enzimas, competindo assim com o seu substrato natural. Esta ligação bloqueia a ligação do substrato à enzima fazendo com que o processo final da formação do peptidoglicano se dê a uma taxa mais baixa. Dado que a síntese de peptidoglicano cessa, mas que a síntese dos restantes componentes do citoplasma se mantém, acaba por ocorrer a lise da célula (Bryan e Godfrey, 1991; Macheboeuf *et al.*, 2006).

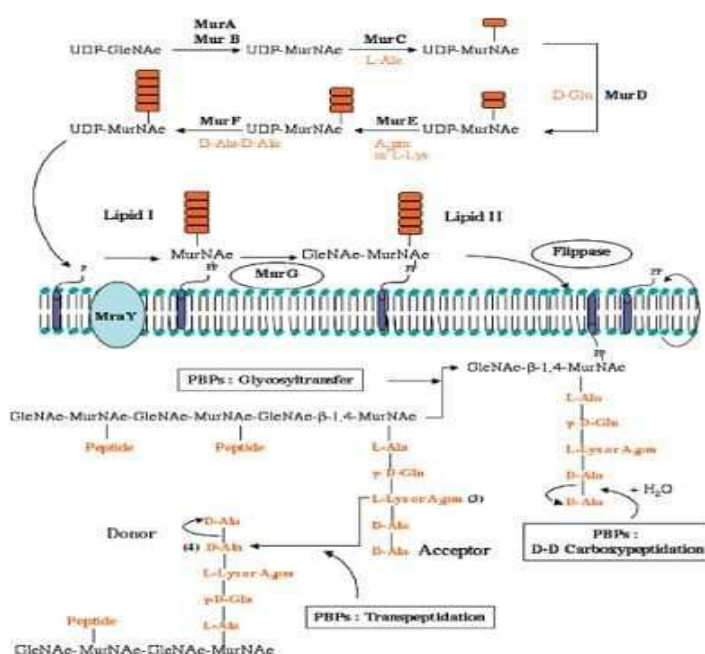


Figura 3 – Esquema da síntese bioquímica do peptidoglicano, apresentando as fases intra e extramembranar (adaptado de Macheboeuf *et al.*, 2006).

1. Penicilinas

As penicilinas diferem entre si, essencialmente, no seu espectro de actividade contra as bactérias Gram-negativas e resistência às penicilases estafilocólicas. As penicilinas naturais são produzidas, normalmente, pela actividade fermentativa de estirpes mutantes de *Penicillium chrysogenum*, em meios aos quais foram adicionados determinados precursores, com a função de induzir uma maior produção de penicilina com determinada cadeia lateral (Demain e Elander, 1999; Murray *et al.*, 2002).

As aminopenicilinas, como é o caso da ampicilina, são penicilinas semi-sintéticas de largo-espectro, em que o radical R é aminado. Este grupo amina é inserido na posição α do anel β -lactâmico, aumentando a hidrofília da molécula e ampliando, consequentemente, o seu espectro de acção contra as bactérias Gram-negativas, uma vez que conseguem penetrar através dos canais de porina da membrana exterior da parede celular. (Sousa *et al.*, 1988).

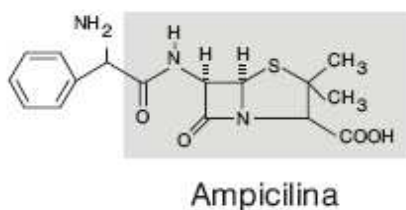


Figura 4 - Estrutura química da ampicilina. A parte da estrutura evidenciada a cinzento é a estrutura geral de todas as penicilinas (adaptado de Rosário e Grumach, 2006).

2. Cefalosporinas

A estrutura das cefalosporinas confere-lhes resistência às β -lactamases produzidas por algumas espécies de bacilos Gram-negativos (Demain e Elander, 1999). Esta classe de antibióticos pode ser dividida em cefalosporinas de 1ª (cefazolina), 2ª (cefaclor), 3ª (cefotaxima) ou 4ª geração (cefepima). Esta nomenclatura está relacionada com modificações nas cadeias laterais destes antibióticos, principalmente nas posições 3 e 7 do anel β -lactâmico, que levam a um aumento do espectro de acção, assim como, à alteração das suas propriedades farmacológicas (Sousa *et al.*, 1988). Assim, uma cefalosporina de geração mais elevada possui um maior espectro para espécies Gram-negativas. O seu largo espectro e baixa toxicidade fazem das cefalosporinas de 3ª geração os agentes de eleição contra infecções bacterianas graves. As cefalosporinas de 4ª geração possuem uma maior capacidade de penetrar na

membrana externa das bactérias Gram-negativas assim como, uma elevada resistência às β -lactamases por elas produzidas.

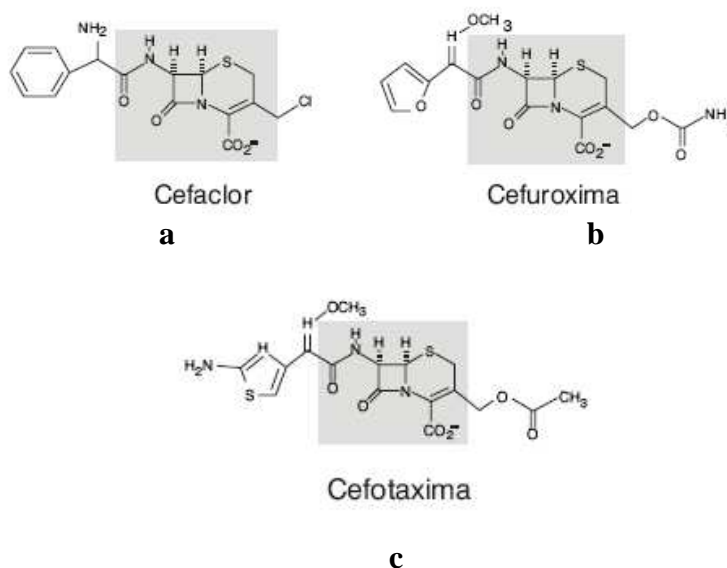


Figura 5 - Estrutura química de algumas cefalosporinas. **a e b** - cefalosporinas de 2º geração; **c**- cefalosporina de 3ª geração (adaptado de Rosário e Grumach, 2006).

3. Carbapenemes (Imipinem, Meropenem)

São os β -lactâmicos com o maior espectro de acção, que se deve à combinação de duas características importantes: a fácil penetração nas células, tanto Gram-negativas como Gram-positivas e o elevado grau de resistência às β -lactamases. Para além do anel β -lactâmico, os carbapenemes caracterizam-se pela existência de um outro anel com cinco membros (Demain e Elander, 1999).

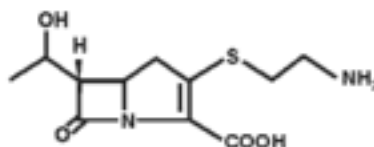


Figura 6 - Estrutura química geral dos carbapenemes (adaptado de Liras e Martín, 2006).

4. Inibidores de β -lactamases

Os inibidores são β -lactâmicos sem actividade antimicrobiana que se ligam irreversivelmente às β -lactamases, tornando-as inactivas. Estes agentes são designados muitas vezes por inibidores “suicidas” uma vez que, para inactivar efectivamente a enzima necessitam, primeiramente, de ser hidrolisados por esta. A combinação destes agentes com um antibiótico β -lactâmico tem elevada eficácia contra as β -lactamases de largo espectro, devido ao efeito sinérgico das duas moléculas; o inibidor destrói a actividade da β -lactamase enquanto o antibiótico é protegido da inactivação. Como exemplo da combinação de um inibidor com um antibiótico β -lactâmico temos o **co-amoxiclave** que consiste na combinação entre uma penicilina (amoxicilina) e o inibidor da β -lactamase, ácido clavulânico. Esta combinação é efectiva contra estirpes de *H. influenzae* resistentes à ampicilina por produção de β -lactamases (Barry *et al.*, 1993).

Susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos

A gravidade das infecções a *H. influenzae* e a necessidade de se actuar com rapidez têm levado ao estabelecimento de uma terapia antimicrobiana empírica. No entanto, a emergência de estirpes resistentes como resultado da pressão selectiva é, hoje em dia, uma realidade preocupante. A utilização, generalizada e sem recomendação, de antibióticos de largo espectro favorece o crescimento e selecção dos microrganismos resistentes, ao eliminar as estirpes sensíveis. Por este motivo torna-se essencial a vigilância sistemática para definir estas tendências, sendo a resistência aos antibióticos considerada um dos grandes problemas de saúde pública, em todo o mundo.

A resistência bacteriana aos β -lactâmicos pode resultar de alterações nos diferentes passos de actuação do antibiótico (Vaz Pato, 1989), sendo os principais mecanismos:

1. Impermeabilização da membrana externa (no caso de bactérias Gram-negativas);
2. Menor afinidade das PBPs para os antibióticos;
3. Hidrólise enzimática do anel β -lactâmico, mediada pelas enzimas β -lactamases (Sousa *et al.*, 1988; Vaz Pato, 1989; Fluit *et al.*, 2001);

4. Aquisição de novas PBPs com baixa afinidade para os β -lactâmicos, via transferência horizontal de genes (como no caso dos *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)). (Lorian, 1991)

Ao contrário do que acontece com outros bacilos Gram-negativos, a membrana externa das estirpes de *H.influenzae* é bastante permeável à penetração dos β -lactâmicos. Nesta espécie a resistência à ampicilina e a outros β -lactâmicos caracteriza-se essencialmente pela produção de β -lactamases ou pela presença de PBPs modificadas, podendo mesmo haver estirpes com os dois tipos de mecanismos.

A produção bacteriana de β -lactamases constitui o mecanismo mais comum de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. As β -lactamases conferem uma resistência significativa aos antibióticos através da hidrólise da ligação amina do anel β -lactâmico, levando à sua destruição (**figura 7**) (Wilke *et al.*, 2005). Estas enzimas podem ter uma origem plasmídica ou cromossómica e ser específicas para penicilinas (penicilases), cefalosporinas (cefalosporinases) ou mesmo possuir um largo espectro de actividade, inactivando a maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Este último grupo de β -lactamases é designado de β -lactamases de largo espectro (**ESBLs**). (Fluit *et al.*, 2001; Murray, 2002)

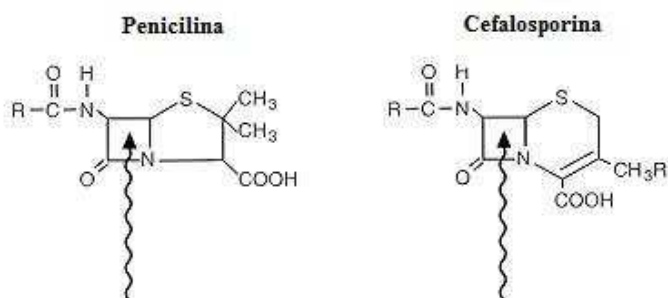


Figura 7 – Esquema do local de acção das β -lactamases nos principais grupos de β -lactâmicos, as penicilinas e as cefalosporinas (Medical Microbiology, 1996).

A presença de PBPs modificadas é outro dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos. Modificações na estrutura destas proteínas levam à diminuição da afinidade para antibióticos β -lactâmicos, fazendo com que seja necessária uma concentração de antibiótico

muito maior para inibir o crescimento das estirpes que desenvolveram este mecanismo de resistência (Ubukata *et al.*, 2001).

1. Mecanismo de resistência enzimático em *Haemophilus influenzae* – Produção de β -lactamase.

A resistência à ampicilina mediada por β -lactamases, foi detectada em *H. influenzae* pela primeira vez no início dos anos 70. As estirpes com este mecanismo de resistência são normalmente designadas por BLPAR (“ β -lactamase positive ampicillin resistant” ou estirpes β -lactamase positivas resistentes à ampicilina). A β -lactamase produzida por estirpes de *H. influenzae* resistentes à ampicilina é uma enzima constitutiva semelhante às que são produzidas por outros organismos Gram-negativos, tendo sido identificada pela primeira vez em 1975, como uma β -lactamase do tipo TEM (Vega *et al.*, 1976). Em 1981, foi encontrada uma nova β -lactamase em estirpes de *H. influenzae* resistentes à ampicilina denominada ROB-1, com um perfil de substrato bastante idêntico ao da TEM, mas raramente identificada (Rubin, *et al.*, 1981). Apesar de, normalmente, uma estirpe produzir apenas uma destas enzimas, já foram isoladas estirpes que produziam as duas enzimas, TEM-1 e ROB-1, em simultâneo (Karlowsky *et al.*, 2000).

As enzimas TEM-1 e TEM-2 são enzimas de largo espectro, codificadas por plasmídios, muito comuns entre as bactérias Gram-negativas. Pertencem à classe A no sistema de Ambler (Ambler, 1980) e à classe 2b segundo o sistema Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995), diferem entre si apenas por uma substituição, na posição 39, de uma glutamina por uma lisina (Gln39Lys), que origina uma mudança no ponto isoelétrico, de 5,4 (TEM-1) para 5,6 (TEM-2) (Bradford, 2001). Estas enzimas são codificadas pelos genes *bla*_{TEM} que são transponíveis, estando o gene *bla*_{TEM-2} normalmente associado ao transposão 1 (Tn1) e o gene *bla*_{TEM-1} associado a uma variedade de transposões, incluindo o Tn2 e Tn3 (Tristam *et al.*, 2007).

Estudos anteriores parecem indicar que o gene *bla*_{TEM} presente em *H. influenzae* foi adquirido através de um transposão do tipo Tn2 ou Tn3 de uma *Enterobacteriaceae* para um plasmídio críptico já existente em espécies de *Haemophilus*. Em *H. influenzae* existem dois grupos de plasmídios bastante distintos que codificam uma enzima TEM. Um plasmídio de baixo peso molecular (<10kb), não conjugativo, que normalmente transporta o gene *bla*_{TEM} como o único determinante de resistência e um plasmídio maior (\pm 40kb), com propriedades

conjugativas, que muitas vezes transporta simultaneamente outros genes como, por exemplo, genes de resistência para o cloranfenicol e a tetraciclina entre outros antibióticos. Os plasmídios de maior peso molecular são mais comuns e parecem ter maior importância na disseminação dos genes *bla*_{TEM}. (Sauders *et al.*, 1978).

Como já foi referido, a β -lactamase ROB-1 foi descrita pela primeira vez em 1981 num isolado clínico Hib responsável por um caso de meningite. Na grande maioria dos isolados contendo esta enzima, o gene está localizado num pequeno plasmídio com cerca de 4,1 e 5,0 kb. A sequência nucleotídica do gene ROB-1 e a sua sequência aminoacídica indicam que esta é uma enzima de classe A, contudo mais idêntica às β -lactamases das bactérias Gram-positivas do que das Gram-negativas. Por exemplo, a zona circundante do centro activo da enzima, alanina-67, tirosina-68, alanina-69, é muito idêntica à encontrada na enzima PCI de *S. aureus*, apesar de o centro activo, em si, ser idêntico ao de outras espécies Gram-negativas STFK (serina-70, treonina-71, phenilalanina-72, lisina-73) (Livrelli *et al.*, 1991).

2. Mecanismo de resistência não enzimático à ampicilina em *Haemophilus influenzae*

H. influenzae possui 8 PBPs, designadas por PBPs 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 4, 5 e 6, com características de ligação para diferentes β -lactâmicos muito similares às PBPs identificadas em *E. coli* (Tristam *et al.*, 2007). Nesta espécie, a resistência aos β -lactâmicos por diminuição de afinidade para as PBPs parece estar relacionada essencialmente com alterações nas PBP3A e PBP3B (Tristam *et al.*, 2007).

A PBP3 é uma proteína relativamente grande, com 601 resíduos aminoacídicos, codificada pelo gene *ftsI*. É uma PBP uni-funcional (classe B) constituída por um domínio citoplasmático, um segmento transmembranar e um domínio periplasmático onde se encontra o centro catalítico com actividade de transpeptidase. O domínio catalítico é constituído por aproximadamente 340 resíduos aminoacídicos e responsável pelo processo de “cross-linking” do peptidoglicano (Wissel e Weiss, 2004), assim como essencial para o processo de divisão celular, actuando na formação do septo (Sauvage *et al.*, 2008). A maioria das enzimas de ligação à penicilina, incluindo as PBP3 possuem três domínios aminoacídicos altamente conservados, que são essenciais para a sua função. Na PBP3 de *H. influenzae* estes domínios são S327-T-V-K, S379-S-N e K513-T-G (Tristam *et al.*, 2007).

A resistência à ampicilina em *H. influenzae* não produtores de β -lactamases (BLNAR) foi descrita pela primeira vez em 1974, por *Thornsberry e Kirven*. Em 1984, *Parr e Bryan* recorrendo ao DNA genómico de uma estirpe Hib resistente à ampicilina e não produtora de β -lactamase, transformaram uma estirpe susceptível numa estirpe de fenótipo BLNAR, tendo demonstrado ainda a reduzida afinidade das PBP3A e PBP3B para alguns antibióticos, tanto na estirpe dadora como na estirpe transformada (*Tristam et al.*, 2007).

É difícil definir com precisão o que são estirpes BLNAR. No sentido lato da palavra são estirpes que não produzem β -lactamases mas que são caracterizadas por uma concentração inibitória mínima (CIM) à ampicilina superior ao *breakpoint* (4 $\mu\text{g/ml}$) definido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) sendo assim consideradas resistentes a este antibiótico. Contudo, estirpes com uma CIM de 2,0 $\mu\text{g/ml}$ causam alguma ambiguidade, uma vez que segundo o CLSI são classificadas na categoria de resistência intermédia à ampicilina. Hoje em dia é possível classificar estas estirpes de *H. influenzae* com base no mecanismo de resistência não enzimático e não apenas no valor da CIM para a ampicilina.

A sequência de DNA da região do gene *ftsI* que codifica a transpeptidase das PBP3, em *H. influenzae*, foi determinada por *Ubukata e colaboradores* em 2001 (*Ubukata et al.*, 2001). Esta informação permitiu o estudo das sequências aminoacídicas das estirpes BLNAR e consequente comparação com as sequências de estirpes controlo susceptíveis à ampicilina. Muitas das substituições encontradas no gene das estirpes BLNAR, por *Ubukata* localizam-se perto de zonas bastante conservadas. Estudos posteriores levaram à identificação de substituições associadas ao fenótipo BLNAR em 24 aminoácidos diferentes (*Kim et al.*, 2007; *Hotomi et al.*, 2007; *García-Cobos et al.*, 2007; *Shuel e Tsang.*, 2009). É interessante notar que, apesar de as estirpes estudadas nestes trabalhos, terem sido isoladas entre os anos de 1988 e 2004 e terem origens geográficas diversificadas, as substituições presentes são consistentes entre os diversos estudos, sugerindo que apenas substituições, em certas posições, estão associadas com a resistência. Apesar de não existir uma substituição que esteja presente em todas as estirpes, certas mutações são caracterizadas com bastante frequência: Asn526Lys, Arg517His, Met377Ile, Ser357Asn e Asp350Asn, podendo encontrar-se, numa só estirpe, de 1 até 11 substituições diferentes (*Tristam et al.*, 2007). Baseado na presença destas substituições e no nível de resistência, *Ubukata e os seus colaboradores* dividiram as estirpes BLNAR em três grupos mutacionais: o grupo I caracterizado pela presença da

Substituição Arg517His, o grupo II com a substituição Asn526Lys e o grupo III caracterizado pela presença, em simultâneo, das substituições Met377Ile, Ser385Thr e/ou Leu289Phe (Ubukata *et al.*, 2001). Em alguns estudos realizados na Europa e na Coreia este último padrão mutacional é muito pouco comum, aparecendo, normalmente, estirpes com apenas uma destas substituições (Kim *et al.*, 2007; García-Cobos *et al.*, 2007; García-Cobos *et al.*, 2008). Em trabalhos realizados em Espanha por García-Cobos e colaboradores, algumas das estirpes estudadas apresentavam as substituições Met377Ile e Ser385Thr, sem a presença das restantes substituições que caracterizam o grupo III sugerido por Ubukata (Ubukata *et al.*, 2001), tendo estas estirpes sido denominadas III-like (García-Cobos, 2007). Em 2002, Dabernat e colaboradores, sugeriram uma subdivisão do grupo II, em 4 subgrupos: IIa, IIb, IIc, IId, baseado na presença de outras substituições para além da substituição Asn526Lys que define este grupo. Assim, o grupo IIa é caracterizado pela presença apenas desta substituição; os grupos IIb, IIc e IId para além da presença desta substituição, são ainda caracterizados pelas substituições Val502Ala, Val502Thr e Val449Ile, respectivamente (Dabernat *et al.*, 2002). Baseado na diferença da CIM à ampicilina, Hasegawa classificou as estirpes dos grupos I e II como sendo “low”-BLNAR, uma vez que normalmente possuem uma CIM à ampicilina entre 0,5 e 2,0 µg/ml e as estirpes do grupo III como BLNAR apresentando, normalmente, uma CIM à ampicilina entre 1,0 e 16 µg/ml (revisto em Ubukata *et al.*, 2002).

As estirpes BLNAR apresentam susceptibilidade reduzida, não apenas para a ampicilina mas, também para os outros antibióticos β-lactâmicos, particularmente para as cefalosporinas. Estudos de afinidade para diversos antibióticos β-lactâmicos em estirpes susceptíveis demonstraram que também as cefalosporinas possuem elevada afinidade para as PBP3A e PBP3. Assim, actualmente, é recomendado que as estirpes BLNAR sejam também consideradas resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico (co-amoxiclave), às cefalosporinas de 2ª geração cefaclor e cefuroxime, apesar da aparente susceptibilidade *in vitro* (Tristam *et al.*, 2007; CLSI, 2009).

Diversos estudos que se debruçaram sobre a possível clonalidade das estirpes BLNAR, demonstraram que estas estirpes são genotipicamente diversas, havendo, no geral, ausência de disseminação clonal. Na maioria dos países, estas estirpes parecem disseminar-se de um modo independente, possivelmente devido ao uso generalizado de antibióticos para o tratamento de infecções respiratórias (Campos *et al.*, 2004; Hotomi, *et al.*, 2007; García-Cobos *et al.*, 2007).

3. Resistência combinada

Apesar do termo BLPACR ser a abreviatura para “*β-lactamase positive amoxicillin-clavulanate resistant*” ou “estirpes produtoras de β -lactamases resistente ao co-amoxiclave” este não é um termo que represente de um modo inequívoco o mecanismo de resistência existente. Estirpes BLPACR combinam a produção de β -lactamases com a existência de PBP3 alteradas. Estudos anteriores demonstraram que, ao comparar estirpes BLNAR e BLPACR com substituições idênticas na PBP3, as estirpes com ambos os mecanismos possuíam uma CIM para a ampicilina muito superiores e que a CIM para as cefalosporinas era idêntica, indicando que a contribuição das β -lactamases para a resistência é limitada à ampicilina (Ubukata *et al.*, 2002; Tristam *et al.*, 2007). Estes dados foram confirmados por Matic e colaboradores, em 2003, quando transformaram uma estirpe sensível de *H. influenzae* com um gene *ftsI* de uma estirpe BLPACR e verificaram que a única diferença significativa entre a estirpe BLPACR e a estirpe transformada era uma CIM para a ampicilina mais elevada (Matic *et al.*, 2003).

As estirpes BLPACR passam, normalmente, despercebidas, uma vez que ao produzirem β -lactamases a sua resistência é atribuída apenas a este facto, ignorando a presença /ausência de substituições importantes na PBP3.

Posto isto, o principal objectivo do trabalho aqui apresentado foi caracterização dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em 240 estirpes de *Haemophilus influenzae*, isoladas em Portugal, através da análise dos principais genes que conferem resistência nesta espécie (*bla_{TEM}* e *ftsI*). Esta caracterização consistia na identificação das mutações na região da transpeptidase do gene *ftsI* e consequente relação com o mecanismo de resistência, assim como na pesquisa do gene responsável pela produção da enzima β -lactamase.

Materiais e Métodos

Estirpes bacterianas

Neste trabalho foi estudado um grupo de 240 estirpes clínicas de *H. influenzae*, produtoras e não produtoras de β -lactamases, provenientes de vários laboratórios hospitalares em Portugal, isoladas entre os anos de 2001 e 2008.

A amostra era constituída por estirpes isoladas de indivíduos de ambos os géneros e com idades compreendidas entre os 0 e 95 anos. As estirpes foram isoladas de diversos produtos biológicos, conforme indicado na **tabela I**.

Tabela I – Origem das estirpes de *H. influenzae*, distribuídas por ano de isolamento.

Produto Biológico	Distribuição das estirpes por ano de isolamento								
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Totais
Ex. Auricular	---	---	---	---	---	2	4	5	11
ENF	---	---	---	1	1	---	---	1	3
EXP	2	5	---	1	12	13	25	22	80
LBA	3	7	1	5	12	4	18	33	83
Ex. Ocular	3	2	1	4	7	8	6	12	43
LCR/Hem/ LP	---	3	1	---	2	2	1	---	9
Desconhecidas	---	---	---	---	---	---	1	1	2
Outros	1	---	---	---	2	---	2	4	9
Total	9	17	3	11	36	29	57	78	240

ENF- Exsudado faríngeo, nasal e nasofaríngeo; **EXP**- Expectoração; **LBA**- Lavado alveolar, brônquico, e brônco-alveolar; **Hem**- Hemocultura, **LCR**- líquido cefalo-raquidiano, **LP**- líquida pleural; **Outros** – Cateter, líquido de diálise, pus e secreções do tubo endotraqueal.

A amostra a estudar foi escolhida do seguinte modo: em primeiro lugar foram seleccionadas estirpes com uma CIM à ampicilina classificadas como estirpes de resistência

intermédia (2µg/ml), um conjunto de estirpes consideradas sensíveis com uma CIM para ampicilina igual a 1 µg/ml e ainda um conjunto de estirpes produtoras de β-lactamases com uma CIM para a ampicilina ≥ 8 µg/ml. Foi ainda escolhido um grupo de estirpes sensíveis à ampicilina com uma CIM $\leq 0,5$ µg/ml, que serviu de controlo.

Tabela II – Estirpes de referências usadas como controlo.

Estirpe de referência	Origem	Características	Ensaio onde é utilizada
ATCC® 49247	CLSI 2009	<i>H. influenzae</i> BLNAR	Determinação de CIM
HC- 25	van Klingerem RIVM, Holanda	<i>H. influenzae</i> produtora de β-lactamase (BLPAR)	Determinação de CIM; Pesquisa de β-lactamase; PCR
<i>H. parainfluenzae</i>	Estirpe clínica	---	Identificação de <i>H. influenzae</i> por PCR

Determinação da produção de β-lactamases por teste cromogénio

A produção β-lactamases foi pesquisada através de um teste cromogénio usando uma cefalosporina, o Nitrocefim (Oxoid Limited, UK). Em 20 µl de Nitrocefim ressuspenderam-se 5 a 6 colónias de *H. influenzae*, com a ajuda de uma ansa, registando-se ao fim de alguns minutos a reacção colorimétrica. Nas estirpes positivas para a produção de β-lactamase, a cefalosporina passou de amarelo para vermelho, devido à destruição do anel β-lactâmico. A estirpe controlo utilizada foi uma estirpe produtora de β-lactamase: HC-25 (gentilmente cedida por Dr. van Klingerem, RIVM, Holanda).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em ambos os métodos de determinação de CIM foi utilizada para controlo a estirpe de referência ATCC® 49247 (CLSI, 2009) e HC-25 (van Klingerem, RIVM, Holanda).

1. Método de Microdiluição em Placa

A susceptibilidade aos antibióticos em *H. influenzae* foi determinada pelo método de microdiluição MICroSTREP plus tipo 3 (Dade Behring Inc, West Sacramento, USA). Cinco a seis colónias foram ressuspensas em frascos com 3 ml de água autoclavada e desionizada (Dade Behring), de forma a obter um padrão de turvação equivalente ao padrão de Marcfarland 0,5. Posteriormente, inocularam-se 100 µl dessa suspensão em 25 ml de meio de

crescimento *Haemophilus* Test Medium (HTM, Dade Behring). O inóculo foi distribuído na placa MICroSTREP plus tipo 3 com o auxílio de um inoculador (RENOK). Por fim as placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20-24 horas numa atmosfera sem CO_2 . Efectuou-se o registo da CIM para cada antibiótico estudado com a finalidade de classificar as estirpes nas diferentes categorias de susceptibilidade (**tabela III**), de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI (2009):

Tabela III – Critérios interpretativos segundo o CLSI para os antibióticos estudados na determinação da susceptibilidade em *H. influenzae* (CLSI, 2009).

		Categorias de susceptibilidade ($\mu\text{g/ml}$)		
Agente Antimicrobiano	Abreviaturas	Sensível	Intermédio	Resistente
Amoxicilina/clavulanato de potássio	Aug	$\leq 4/2$	-----	$\geq 4/8$
Ampicilina	Amp	≤ 1	2	≥ 4
Azitromicina	Azi	≤ 4	-----	-----
Cefaclor	Cfr	≤ 8	16	≥ 32
Cefepime	Cpe	≤ 2	-----	-----
Cefotaxima	Cft	≤ 2	-----	-----
Cefuroxima	Crm	≤ 4	8	≥ 16
Cloranfenicol	C	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloxacina	Cp	≤ 1	-----	-----
Meropenem	Mer	≤ 0.5	-----	-----
Rifampina	Rif	≤ 1	2	≥ 4
Tetraciclina	Te	≤ 2	4	≥ 8
Trimetoprim/sulfametoxazol	T/S	$\leq 0.5/ 9.5$	1/19- 2/38	$\geq 4/76$

2. Método de diluição em meio sólido (agar)

Para as estirpes que apresentaram uma CIM à ampicilina $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ no método de microdiluição procedeu-se à determinação da CIM de uma forma mais precisa pelo método de diluição do antibiótico em agar Mueller-Hinton chocolate. Foi avaliada uma gama de concentrações de ampicilina de $2 \mu\text{g/ml}$ a $512 \mu\text{g/ml}$, obtidas através de diluições sucessivas. As placas de Petri foram preparadas do seguinte modo: adicionaram-se 2 ml de cada uma das soluções do antibiótico a 18 ml de agar Mueller-Hinton chocolate. Como controlo de crescimento utilizámos 2 placas sem antibiótico. A suspensão de cada amostra a ser testada foi preparada ressuspendendo-se 4 ou 5 colónias de uma cultura de 18 horas, em soro fisiológico, até se obter uma turvação semelhante à unidade 0,5 de MacFarland (aproximadamente 5×10^7 a 10^8 UFC/ml). As placas foram inoculadas com o auxílio de um *steers replicator*, que depositou 1 a 2 μl de inóculo, o equivalente a 10^4 UFC. As placas foram seguidamente incubadas a 35°C durante 18-20 horas. Após a incubação das placas a CIM foi determinada segundo a presença/ausência de crescimento nas placas, sendo, neste caso, a concentração inibitória mínima a concentração de antibiótico a partir da qual não se observa crescimento de colónias.

Extracção de DNA

A extracção de DNA foi efectuada por uma técnica de fervura. Cinco ou seis colónias de *H. influenzae* foram ressuspendidas em 60 μl de água bi-distilada (Labesfal, Lisboa, Portugal) e fervidas em banho-maria numa placa de aquecimento (IKA-Werke GmbH & Co. KG, MEC2P, Pombal, Portugal), durante 15 min. O DNA foi separado dos restantes constituintes da célula por centrifugação a 4°C e 13000 rpm durante 8 min (2K15, Sigma-Aldrich Co.). Após a centrifugação foram retirados 45 μl de sobrenadante, contendo o DNA, e colocados num novo tubo eppendorf devidamente identificado.

Identificação de H. influenzae por PCR – amplificação do gene P6.

A confirmação da identificação das estirpes de *H. influenzae* foi realizada através da amplificação de um fragmento interno do gene P6, que codifica uma proteína de membrana externa, específica desta espécie, com 198 pb.

1. Mistura reaccional

A amplificação foi realizada num volume final de 25 µl, sendo a mistura reaccional para uma reacção (1x) constituída por 0,2 mM de cada um dos 4 dNTPs, (Roche Diagnostics GmbH), 0,2 µM de cada *primer* específico para a amplificação do gene P6 (P6 *forward* e P6 *reverse*, anexo I), 3,0 mM de MgCl₂ (Quiagen, Izasa, Lisboa, Portugal), 1,25 U de *Taq* *polimerase* (Quiagen), 1x de tampão (Quiagen). Aos 24 µl da mistura reaccional adicionou-se 1,0 µl de DNA. Como controlo foram utilizados DNA de *Haemophilus parainfluenzae* e DNA de uma estirpe padrão, previamente identificada como *H. influenzae*.

2. Programa de amplificação

A amplificação do gene P6 foi efectuada num termociclador DNA Engine DYAD (MJResearch Waltham, MA, USA), através do seguinte programa de amplificação: Um primeiro ciclo de pré-desnaturação a 94°C durante 7', seguido de 30 ciclos de amplificação de acordo com as seguintes condições: 1' de desnaturação a 94°C, 2' de *annealing* a 54°C e 1' de extensão a 72°C. A extensão final ocorreu durante 10' a 72°C.

3. Visualização dos resultados da amplificação

A análise dos resultados foi feita por electroforese em gel de agarose (Qbiogene Inc., Bioportugal, Porto, Portugal) a 1% (p/v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) (0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA; pH 8,0), durante 45 minutos a 120 V (Thermohidrobaid Electro-4, Bio-Rad). A adição de 1 µl de Brometo de etídio (Sigma) para 100 ml de gel permitiu a visualização das bandas num transiluminador ultravioleta (Hoefer). Os resultados foram fotografados com Gel Doc 2000 (Bio-Rad) e analisados em comparação com o marcador de peso molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH) com bandas entre 1114 pb e 67 pb.

Determinação da presença de cápsula em estirpes de H. influenzae

1. Identificação da presença de cápsula por amplificação de um fragmento interno do gene *bexA* por PCR

A presença de cápsula nas estirpes de *H. influenzae* foi determinada pela amplificação de um fragmento interno do gene *bexA*, com 343 pb. Este gene apenas é amplificado em estirpes capsulares, não havendo, assim, amplificação deste fragmento nas estirpes NC.

a. Mistura reaccional

A amplificação foi realizada num volume final de 25 µl, sendo a mistura reaccional para uma reacção (1x) constituída por 0,5 mM de cada um dos 4 dNTPs (Roche Diagnostics GmbH), 0,16 µM de cada primer específico para a amplificação do gene *bexA* (Eurogentec, Seraing, Belgium) (anexo I), 3,5 mM de MgCl₂ (Bioline, UK), 0,5 U de *Taq polimerase* (Biotaq, Bioline, UK), 1x de tampão (Bioline). Aos 23,5 µl da mistura reaccional adicionou-se 1,5 µl de DNA. Como controlo foi utilizado DNA de estirpes controlo capsuladas, com serótipos conhecidos, sendo assim positivas para a presença do gene *bexA*.

b. Programa de amplificação

A amplificação do fragmento interno do gene *bexA* ocorreu num termociclador DNA Engine DYAD (MJResearch), através do seguinte programa de amplificação: Um primeiro ciclo de pré-desnaturação a 94°C durante 5', seguido de 30 ciclos com o seguinte programa de amplificação: 1' de desnaturação a 94°C, 1' de *annealing* a 55°C e 1' a 72°C para a extensão. A extensão final ocorreu durante 10' a 72°C.

c. Visualização dos resultados da amplificação

Os resultados desta amplificação foram observados e analisados de forma idêntica à anteriormente descrita, utilizando o mesmo marcador de peso molecular.

2. Identificação dos serótipos por testes serológicos

Para estirpes positivas para a presença de cápsula, foram efectuados testes de aglutinação com antisoros específicos para cada serótipo (**a a f**) (*Haemophilus influenzae* Antisera, BD Difco, NJ, USA). Numa lamela colocou-se uma gota do reagente, ao qual se adicionou 1 ou 2 colónias da estirpe a estudar. A aglutinação ocorria quando a estirpe possuía o serótipo correspondente ao anti-soro utilizado.

3. Determinação do Serótipo por PCR

Foi realizado um PCR para confirmar os testes serológicos, com *primers* específicos para cada serótipo a caracterizar (anexo I) sendo, tanto a mistura reaccional como o programa de amplificação, iguais aos anteriormente descritos para a pesquisa de cápsula.

Detecção dos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos por PCR

1. Detecção do gene *ftsI*, que codifica a PBP 3

a. Mistura reaccional

A amplificação foi realizada num volume final de 50 μ l, sendo a mistura reaccional para uma reacção (1x) constituída por 0,2 mM de cada um dos dNTPs (TaKaRa, Bio Inc., Shiga, Japão), 1 μ M de cada *primer* específico para a amplificação do gene *ftsI*: *ftsI* forward e *ftsI* reverse (anexo I), 2U de enzima *Taq*TM (TaKaRa) e 1x tampão com MgCl₂ (20 mM) (TaKaRa). Aos 48 μ l de mistura de reacção adicionaram-se 2 μ l de DNA. Para esta amplificação não foi utilizado nenhum controlo positivo, uma vez que este gene é expresso em todas as estirpes de *H. influenzae*.

b. Programa de Amplificação

A amplificação do gene *ftsI* ocorreu num termociclador DNA Engine DYAD, da MJ Research, através do seguinte programa de amplificação: Um primeiro ciclo de pré-desnaturação a 95°C durante 5', seguido de 30 ciclos de amplificação de acordo com as seguintes condições: 1' de desnaturação a 95°C, seguido de 1' de *annealing* a 52°C e extensão durante 4' a 72°C. Por fim a extensão final ocorreu durante 10' a 72°C.

c. Visualização dos resultados da amplificação

Os resultados desta amplificação foram observados e analisados de forma idêntica à anteriormente descrita na determinação da cápsula por PCR, exceptuando o marcador de peso molecular utilizado. Para a determinação do tamanho das bandas obtidas foi utilizado o

marcador de peso molecular VII (Roche Diagnostics GmbH) com bandas entre as 8576 e 359 pb, uma vez que a banda esperada tem 1833 pb.

2. Detecção de fragmentos dos genes responsáveis pela produção de β -lactamases (*bla*_{TEM})

a. Mistura reaccional

A amplificação foi realizada num volume final de 25 μ l, sendo a mistura reaccional para uma reacção (1x) constituída por 0,5 mM de cada um dos 4 dNTPs (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), 0,2 μ M de cada *primer* específico para a amplificação do gene *bla*_{TEM} (anexo I), 3,0 mM MgCl₂, 1,25 U de *Taq polimerase* (Quiagen), 1x Q-solution (Quiagen) e 1x de tampão (Quiagen). Aos 24 μ l de mistura reaccional adicionou-se 1 μ l de DNA. Como controlo foi utilizado DNA de uma estirpe previamente estudada, positiva para a presença do gene *bla*_{TEM}, responsável, na maioria dos casos, pela produção de β -lactamase.

b. Reacção de amplificação

A amplificação do gene *bla*_{TEM} ocorreu num termociclador DNA Engine DYAD, da MJ Research, através do seguinte programa de amplificação: Um primeiro ciclo de pré-desnaturação a 94°C durante 7', seguido de 30 ciclos de amplificação nas seguintes condições: 30'' de desnaturação a 94°C, seguido do passo de *annealing* a 56°C durante 1' por fim 30'' de extensão a 72°C. Ao fim dos 30 ciclos a extensão final ocorreu durante 5' a 72°C.

c. Visualização dos resultados da amplificação

Os resultados desta amplificação foram observados e analisados de forma idêntica à anteriormente descrita na determinação da cápsula por PCR. Para a determinação do tamanho das bandas obtidas foi utilizado o marcador de peso molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH) com bandas entre as 1114 pb e 67 pb, uma vez que as bandas obtidas rondam as 1092 pb.

3. Detecção dos genes responsáveis pela produção de β -lactamases por PCR Multiplex

a. Mistura reaccional

A amplificação foi realizada num volume final de 25 μ l, sendo a mistura reaccional para uma reacção (1X) constituída por 0,2 μ M de cada um dos 4 dNTPs (Roche Diagnostics GmbH), 0,2 mM de cada *primer* específico para a amplificação do gene *bla*_{TEM} (P1 e P2, anexo I) 0,2 mM de cada *primer* específico para a amplificação do gene *rob* (Robr e Robs, anexo I) 1x de tampão, com MgCl₂ (20 mM) (Quiagen), 0,5x de Q-solution (Quiagen) e 1,25 U de enzima Taq *Polimerase* (Quiagen). Aos 24 μ l da mistura de reacção adicionou-se 1 μ l de DNA. Como controlo foram DNA de uma estirpe previamente identificada como negativa para a produção de β -lactamase e ainda DNA de uma estirpes confirmada para a presença dos dois genes (*rob* e *bla*_{TEM}).

b. Reacção de amplificação

A amplificação ocorreu num termociclador DNA Engine DYAD (MJResearch), através do seguinte programa de amplificação: Um primeiro ciclo de pré-desnaturação a 94°C durante 7', seguido de 30 ciclos de amplificação, segundo o seguinte programa de amplificação: 1' de desnaturação a 94°C, seguido do passo de *annealing* durante 2' a 61°C e extensão durante 1' a 72°C. Ao fim dos 30 ciclos a extensão final ocorreu durante 10' a 72°C.

c. Visualização dos resultados da amplificação

A análise de resultados foi realizada de forma idêntica à referida anteriormente, utilizando o marcador de peso VIII (Roche).

Purificação do produto de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi efectuada através de uma reacção enzimática com um conjunto de duas enzimas hidrolíticas designado de ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH). Este composto contém uma exonuclease e uma fosfatase (Exonuclease I e Shrimp Alkaline phosphatase) que possuem como principal função a remoção de *primers* e dNTPs em excesso nos produtos de PCR.

1- Mistura reaccional

A 10 µl do produto de PCR adicionou-se 6 µl da enzima ExoSAP. A reacção ocorreu no termociclador (MJResearch) durante 30', segundo o programa reaccional: 15' a 37°C e 15' a 80°C.

2- Visualização dos resultados da purificação

A análise de resultados foi efectuada de forma idêntica à referida anteriormente, através de uma electroforese em gel de agarose a 1,1%, com 4 µl do produto de PCR purificado e 2 µl de azul de bromofenol.

Sequenciação do gene ftsI

Após a purificação, procedeu-se à sequenciação da região codificante da transpeptidase, do *gene ftsI*, localizada entre os nucleótidos 1199217 e 1199884, com base na sequência de *Haemophilus influenzae* Rd KW20 (GenBank accession nº NC_000907, NCBI), por sequenciação directa com o kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Porto, Portugal), num sequenciador ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Lisboa Portugal).

1. Mistura reaccional

A marcação terminal dos dNTPs, para posterior sequenciação, foi feita através de uma reacção de amplificação com a seguinte mistura para perfazer 10 µl de reacção: 2 µl de *Big Dye Terminator ready mix template*, 0,4 µl (2 pmol) de cada *primer ftsIrev* e *ftsIinrev* (anexo I) e 1µl de DNA purificado. Este procedimento foi efectuado em duplicado para cada amostra, utilizando os dois *primers* descritos, de forma a ser possível sequenciar todo o gene amplificado.

2. Programa de marcação

A marcação do DNA para sequenciação foi efectuada num termociclador DNA Engine DYAD, da MJ Research, através do seguinte programa: Um primeiro ciclo de pré-

desnaturação a 96°C durante 1', seguido de 25 ciclos: 10'' a 96°C, 5'' de *annealing* a 50°C e 3,3' a 60°C.

O restante procedimento da sequenciação foi realizado no Laboratório de Sequenciação do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, onde se procedeu a remoção dos terminadores por precipitação alcoólica, a migração do DNA no sequenciador automático e a elaboração dos electroferogramas.

3. Análise de resultados

As sequências nucleotídicas obtidas foram visualizadas e transformadas em ficheiros FASTA, com o programa informático FinchTV versão 1.4.0 (Geospiza Inc.). A partir do ficheiro FASTA a sequência foi traduzida para a respectiva sequência proteica através do programa bioinformático *Expansy Translate Tool* (Expansy, SIB, Switzerland), procedendo-se de seguida ao alinhamento desta com uma sequência do gene *ftsI* proveniente de uma estirpe susceptível, *Haemophilus influenzae* Rd KW20 (GenBank accession nº NC_000907, NCBI) no programa BLAST (NCBI). Após o alinhamento das sequências foram identificadas as mutações existentes no gene das estirpes em estudo.

Electroforese em campo pulsado - PFGE

1. Extracção de DNA e preparação dos discos de agarose

As estirpes foram semeadas em placas de agar chocolate com polivitex e incubadas durante 18h a 35°C com 5% de CO₂. Ressuspendeu-se aproximadamente ½ ansa de cultura em 1,5 ml de solução de lavagem (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M; pH 7.5) e centrifugou-se a 6000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1,5 ml de solução de lavagem. Mediu-se a densidade óptica (OD) a 420 nm de uma diluição de 1:10 da suspensão bacteriana. Para se obter uma concentração de 10⁹ UCF/ml ajustou-se a concentração da suspensão para 500 µl totais. A cada tubo com 500 µl de suspensão foram adicionados 500 µl de agarose *low-melting point* a 2% (SeaPlaque, FMC BioProducts, USA), mantendo-se a mistura da suspensão com a agarose em banho-maria a 50°C. Após o arrefecimento a mistura foi distribuída por moldes (discos) e arrefecida a -20°C durante 2 minutos, seguidos de 15' a 4°C, para solidificação dos discos. A lise das células foi efectuada a 55°C com 2 ml de tampão de

lise (EDTA 0,5 M, EGTA 0,1M, 1% Lauril Sarcosil (w/v); pH 9) e 25 µl de Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH), durante 3 horas com agitação. Após 3 horas, a solução de lise foi substituída por mais 2 ml da mesma solução com 25 µl de Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH) adicionais. A incubação fez-se *overnight* nas mesmas condições. No fim da reacção de lise retirou-se o tampão e procedeu-se à lavagem dos discos com 5 ml de TE 1x a 4°C (solução stock TE 10x: 10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8). A lavagem dos discos foi feita à temperatura ambiente durante 15' repetindo-se 3 vezes. Os discos foram acondicionados em 2 ml de TE, a 4°C para futura utilização.

2. Digestão com enzima de restrição *SmaI*

Para a restrição do DNA, os discos foram pré-incubados durante 30', com 150 µl tampão 1x NEBuffer 4 (50mM acetato de potássio, 20mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 1 mM DDT, pH 7,9) (New England BioLabs Inc., Beverly, Mass., USA) à temperatura ambiente. Ao fim de 30', renovou-se a solução tampão à qual se juntaram 20 U da enzima de restrição *SmaI* (New England BioLabs Inc). A digestão ocorreu durante 4 horas a 30°C, adicionando-se ao fim de 2 horas mais 2 U de enzima *SmaI*.

3. PFGE

Após a digestão, os discos foram sujeitos a uma electroforese em campo pulsado em gel de agarose a 1.1% (p/v) (SeaKem® Gold agarose BMA, Rockland, ME, USA) em TBE a 0,5x (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA; pH 8). Para identificar o tamanho das bandas obtidas foi utilizado o marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG marker N0340S* (New England BioLabs Inc). A electroforese decorreu numa tina de campo pulsado (ChefMapper™, Bio-Rad) refrigerada a 12°C, com um pulso a variar linearmente de 5 a 50'' durante 23h a 6V/cm. Após a corrida de PFGE a coloração do gel do fez-se numa tina contendo uma solução de Brometo de etídio (0,5 µg/ml) (Sigma) em TBE 0,5x, durante 10'. O resultado da corrida foi visualizado num transiluminador (Hoefer), fotografado com Gel Doc 2000 (Bio-Rad) e guardado para posterior análise.

4. Análise dos padrões de macrorestrição com a enzima *SmaI*

A análise dos padrões de PFGE foi efectuada com o auxílio do programa informático *BioNumerics* (Applied-Maths, Kortrijk, Belgium). Para a elaboração do dendograma do PFGE, utilizou-se o coeficiente de Dice (S_D), baseado na semelhança de bandas, pelo método

de UPGMA (*unweighted Pair-Group Method by using Average linkages*), com uma tolerância de 1,1% e uma optimização de 1,5%. Foi determinado um valor de *cut-off* para 80% de similaridade, pelo método de *cluster cut-off*, segundo o programa *BioNumerics* (Applied Maths). Isolados com valores de $S_D > 80\%$ foram considerados como pertencendo ao mesmo *cluster*.

Resultados

*Características das estirpes de *H. influenzae**

Estudaram-se 240 isolados clínicos de *H. influenzae*, provenientes de vários Laboratórios Hospitalares em Portugal, isolados entre 2001 e 2008.

Destes, 95 estirpes eram não produtoras de β -lactamase (BLNAR) com susceptibilidade intermédia ou mesmo susceptíveis à ampicilina (CIM= 2 μ g/ml e CIM = 1 μ g/ml), de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI (2009). Oitenta estirpes eram resistentes à ampicilina por produção β -lactamase (CIM entre 4 e >512 μ g/ml). Como controlo foram analisadas 65 estirpes susceptíveis à ampicilina (CIM \leq 0,5 μ g/ml).

As características da amostra estão resumidas na **tabela IV**.

Tabela IV- Origem das estirpes clínicas de *H. influenzae*.

Características	n (%)
Género	
Masculino	138 (57,5)
Feminino	100 (41,7)
Desconhecido	2 (0,8)
Idade em anos	
Recém-nascidos	3 (1)
≤ 5	117 (49)
6 aos 17	31 (13)
> 18	84(35)
Desconhecida	5 (2)
Produto Biológico	
Auricular	11 (4,6)
ENF	3 (1,2)
EXP	80 (33,3)
LBA	83 (34,6)
Ocular	43 (17,9)
Invasivas	9 (3,8)
Desconhecidas	2 (0,8)
Outros	9 (3,8)
Total	240

Determinação da susceptibilidade aos antibióticos

Apesar do principal objectivo deste trabalho ser a caracterização do mecanismo de resistência aos β -lactâmicos (ampicilina, co-amoxiclave, cefepime, cefotaxima, cefuroxima,

cefaclor e meropenem) foi determinada a susceptibilidade a 13 dos antibióticos de maior importância para o tratamento de infeções causadas por *H. influenzae*. Assim, para além dos antibióticos β -lactâmicos, foi também determinada a susceptibilidade à ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), rifampicina e azitromicina.

Na **tabela V** estão representados os dados referentes à susceptibilidade das estirpes estudadas. De acordo com os critérios de susceptibilidade de *H. influenzae*, determinados pelo CLSI (2009), as 240 estirpes foram divididas em 3 grupos: sensíveis (S), de resistência intermédia (I) e resistentes (R). Todavia, para alguns antibióticos (cefepime, cefotaxima, meropenem, ciprofloxacina e azitromicina), até ao momento não foram definidos *breakpoints*, uma vez que ainda não foram caracterizadas estirpes resistentes. Para estes casos as estirpes são consideradas não susceptíveis quando possuem uma CIM mais elevada estando, na tabela V, representados pela junção dos valores de I+R.

Tabela V – Susceptibilidade aos antibióticos estudados e categorização das estirpes de acordo com a classe de resistência (n=240).

Antibiótico	CIM ₅₀ (μ g/ml)	CIM ₉₀ (μ g/ml)	Susceptibilidade (%)		
			S	I	R
Ampicilina	2	256	42,1	22,1	35,8
Co-amoxiclave	2	4	97,9	0	1,25
Cefepime	$\leq 0,12$	1,5	100	0	
Cefotaxima	$\leq 0,03$	0,06	100	0	
Cefuroxima	2	8	83	8	8,8
Cefaclor	8	>16	63	21	16
Meropenem	0,12	0,25	96	3,3	
Ciprofloxacina	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	100	0	
Cloranfenicol	≤ 1	≤ 1	98,3	0	0,41
Tetraciclina	≤ 1	≤ 1	98,75	0,41	0
SXT	$\leq 0,25$	2	68	4	28
Rifampicina	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	100	0	0
Azitromicina	1	2	97,5	1,7	

S- susceptível, R- resistente; I- resistência intermédia

A análise da tabela de susceptibilidade aos antibióticos (**tabela V**) permite verificar que as percentagens de resistência variam de acordo com o antibiótico em estudo.

Uma vez que a susceptibilidade à ampicilina, foi o principal critério de selecção da amostra em estudo a resistência a este antibiótico (I+R) apresenta valores mais elevados.

Relativamente aos restantes antibióticos:

- Praticamente todas as estirpes (97,9%) são consideradas susceptíveis ao co-amoxiclave.
- Em relação às cefalosporinas de 2ª geração, é possível observar que apesar da maioria das estirpes ser susceptível, existe uma percentagem elevada de resistência (I+R). Assim, 83 % e 63% das estirpes são susceptíveis à cefuroxima e ao cefaclor, respectivamente enquanto, 16,8% e 37% apresentam resistência a estes dois antibióticos;
- Em relação à classe dos carbapenemes, o antibiótico estudado foi o meropenem. Apesar de, hoje em dia, ainda não haver *breakpoints* definidos, é possível observar que 3,3% das estirpes não apresentam susceptibilidade a este antibiótico;
- Noventa e oito por cento das estirpes são susceptíveis à tetraciclina e ao cloranfenicol, havendo apenas uma estirpe com resistência intermédia para a tetraciclina e uma estirpe resistente ao cloranfenicol;
- Apenas 68% da amostra é susceptível ao trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), apresentando as restantes valores de resistência (I+R).
- Apesar de ainda não existirem *breakpoints* definidos para a azitromicina, 1,7% das estirpes não são susceptíveis a este macrólide.
- Todas as estirpes estudadas são susceptíveis à ciprofloxacina e à rifampicina, assim como às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração.

Pesquisa e caracterização da cápsula

A pesquisa da cápsula foi efectuada, para todas as estirpes estudadas, através da amplificação de um fragmento interno do gene *bexA*, por PCR, com os *primers* cap Hi1 e cap Hi2 (anexo I). Na presença de cápsula, a análise dos produtos amplificados revelava uma única banda com 343 pb, correspondente ao fragmento interno, igual para todos os serótipos.

Das 240 estirpes apenas uma era capsulada, tendo sido isolada em 2001. Através do teste de aglutinação e posterior PCR com os primers *cap* Hib1 e *cap* Hib2 (anexo I), foi identificada como pertencente ao serótipo b. Apesar da presença de cápsula, esta estirpe não apresentava qualquer tipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

Deteção dos genes responsáveis pela produção de β -lactamases

A produção de β -lactamase foi determinada para toda a amostra através de um teste cromogénico utilizando o Nitrocefim (Oxoid).

Para as estirpes produtoras de β -lactamase procedeu-se à amplificação dos genes responsáveis pela produção desta enzima. Das 240 estirpes, 80 (33%) eram produtoras de β -lactamase e todas possuíam o gene *bla_{TEM}*, não tendo sido encontradas estirpes com o gene *bla_{ROB}*. Para a maioria das estirpes positivas para a produção de β -lactamase (95%) o gene *bla_{TEM}* foi amplificado com os primers FIN e DEB (anexo I), dando origem a um fragmento com cerca de 1092 pb. Em quatro das estirpes produtoras de β -lactamase (5%) o gene *bla_{TEM}* apenas amplificou com os primers P1 e P2 (anexo I), dando origem a um fragmento de cerca de 716 pb. Na **figura 8** está representado o resultado da amplificação, por PCR, do fragmento interno do gene *bla_{TEM}*, após corrida de electroforese num gel de agarose. Os primers utilizados foram o FIN e DEB (anexo I). A variação no peso molecular das bandas obtidas nas diferentes estirpes deve-se ao facto de estas apresentarem mutações no gene *bla_{TEM}*, que implicam deleções e/ou inserções (Tristam *et al.*, 2005; Barateiro, 2005).

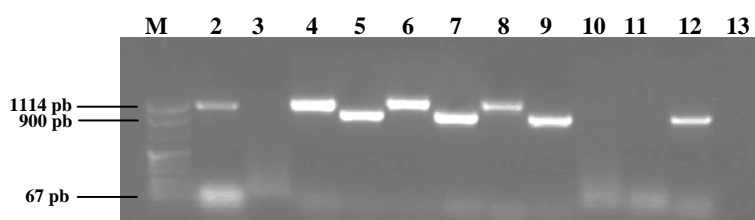


Figura 8 – Electroforese em gel de agarose do fragmento interno do gene *bla_{TEM}*, amplificado por PCR com os primers FIN e DEB. **M** - marcador de peso molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH); **2 a 11**- amostras de DNA em estudo; **12** – controlo positivo; **13** - controlo negativo; As amostras 3, 10 e 11 não apresentam produto de amplificação com estes primers. Nestes casos procedeu-se a uma nova reacção de amplificação com os primers P1 e P2 (anexo I), que amplificam um fragmento menor, com 716 pb, pois apresentam uma deleção no local de ligação dos primers anteriormente descritos.

Amplificação do gene *ftsI* que codifica a PBP3

Como já foi referido, a resistência à ampicilina em *H. influenzae* pode dever-se a mutações no gene *ftsI*, responsável pela produção da proteína membrana PBP3, que levam à diminuição da afinidade desta proteína para os antibióticos β -lactâmicos. De forma a identificar estas mutações foi necessária a amplificação total do gene (1833 pb) por PCR e posterior sequenciação da zona responsável pela função de transpeptidase da PBP3 (Ubukata *et al.*, 2001).

Uma vez que a PBP3 é uma proteína fundamental na síntese de peptidoglicano na parede celular, este gene estava presente em todas as estirpes de *H. influenzae*.

A análise dos produtos amplificados por PCR, com os *primers ftsI_{frw}* e *ftsI_{rev}* (anexo I) revelou a presença de um único fragmento, com o tamanho esperado, 1833 pb.

Sequenciação do gene *ftsI*

A sequência da região da transpeptidase do gene *ftsI* foi determinada em 175 estirpes clínicas de *H. influenzae* com susceptibilidade reduzida para a ampicilina, com ou sem produção de β -lactamases e em 65 estirpes susceptíveis à ampicilina.

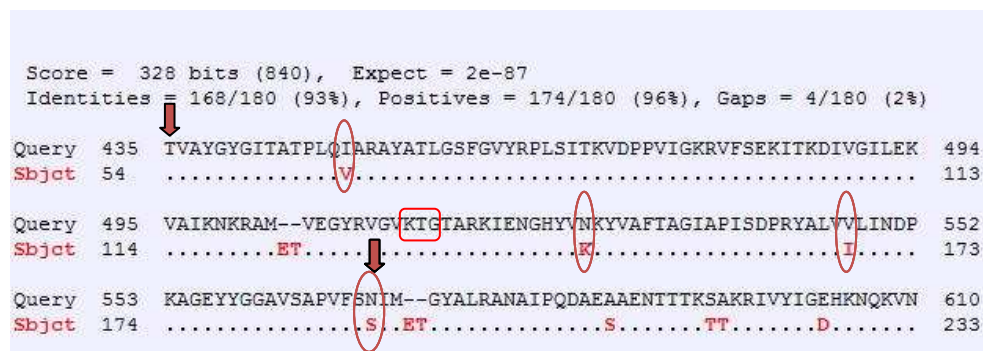


Figura 9 – Alinhamento da sequência de uma parte da região da transpeptidase do gene *ftsI*, entre o aminoácido 435 e 569, entre uma das estirpes estudadas e uma estirpe *controlo* (Rd KW20), através do programa Blast (NCBI). A linha superior corresponde à sequência *controlo* do gene *ftsI*. A linha inferior do alinhamento corresponde à sequência do gene da estirpe em estudo, onde é possível observar as substituições de aminoácidos. A região do gene a estudar está marcada com uma seta, e com um círculo estão representadas as mutações identificadas neste caso. A vermelho está, ainda, representada uma das zonas conservadas, o domínio KTG.

Das 240 estirpes estudadas 176 (73,3%) apresentavam mutações no gene *ftsI*, enquanto 64 possuíam o gene *ftsI* intacto (39 susceptíveis à ampicilina e 25 produtoras de β -lactamase).

Ao analisar os resultados do alinhamento das sequências obtidas, é possível observar que certas substituições aminoacídicas são mais frequentes, aparecendo na maioria das estirpes, independentemente do grupo mutacional em que se inserem. Assim, 85,2% das estirpes com o gene *ftsI* mutado apresenta a substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 547 (Val547Ile) e 76,7% apresenta a substituição de uma asparagina por uma serina na posição 569 (Asn569Ser).

Utilizámos as nomenclaturas de Ubukata (Ubukata *et al*, 2001) e de Dabernat (Dabernat *et al*, 2002) para dividir as estirpes por diferentes grupos mutacionais. Assim, de acordo com Ubukata, as estirpes com mutações no gene *ftsI* foram classificadas em 3 grupos principais (I, II e III), enquanto Dabernat subdividiu, ainda, o grupo II em 4 subgrupos (IIa, IIb, IIc e IId). Oito estirpes produtoras de β -lactamase e 27 estirpes susceptíveis à ampicilina apresentavam mutações no gene *ftsI* que não permitiam a inclusão em nenhum dos grupos acima descritos, não apresentando mesmo relação directa com o mecanismo de resistência não enzimático. Assim, apesar de apresentarem modificações nas PBPs, estas estirpes foram incluídas nos genótipos BLPAR e BLNAS, de acordo com a presença/ausência de β -lactamase.

A **tabela VI** mostra as substituições aminoacídicas caracterizadas em estirpes BLNAR ($n = 94$) e BLPACR ($n = 47$), nas posições circundantes dos domínios conservados SSN e KTG da região da transpeptidase da PBP3 (resíduos 237 ao 577) (Wissel & Weiss, 2004). A identificação destas mutações deu origem a 31 padrões mutacionais, com base nas diferentes substituições. É de notar que a maioria das substituições encontra-se perto do domínio KTG. O grupo mutacional II é o grupo mais comum, caracterizado em 96,5% das estirpes com modificações no gene *ftsI*, o que indica que a substituição, na posição 526, de uma asparagina por uma lisina (Asn526Lys), característica deste grupo, está também entre as substituições mais comuns. Dentro do grupo II, o subgrupo IIb apresenta o maior número de estirpes sendo constituído por 95 estirpes (40% da amostra).

Tabela VI - Substituições aminoacídicas em estirpes BLNAR e BLPACR, nas regiões circundantes dos domínios conservados SSN e KTG, na região da transpeptidase da PBP3.

O grupo mutacional **I**, caracterizado pela substituição de uma arginina por uma histidina na posição 517 (Arg517His), inclui 3 estirpes com dois padrões mutacionais, que diferem apenas numa substituição. Uma das estirpes apresenta, apenas, a mutação Arg517His, determinante deste grupo, e as outras duas estirpes apresentam, adicionalmente, a substituição de uma valina por uma treonina na posição 554 (Val554Thr). Nenhuma das estirpes incluídas neste grupo mutacional é produtora de β -lactamase.

O grupo **II**, é caracterizado pela substituição de uma asparagina por uma lisina na posição 526 (Asn526Lys) e, como já foi referido, anteriormente, divide-se em 4 subgrupos:

- No grupo **IIa** estão incluídas as estirpes que não apresentam nenhuma substituição aminoacídica determinante do fenótipo de resistência, para além da substituição Asn526Lys. Este subgrupo é constituído por 8 estirpes, divididas por 5 padrões mutacionais diferentes.
- O grupo **IIb**, caracterizado pela substituição de uma alanina por uma valina na posição 502 (Ala502Val) em conjunto com a substituição Asn526Lys, é constituído por 95 estirpes, das quais 40 são produtoras de β -lactamases (BLPACR). Apesar de, nestas estirpes, a CIM à ampicilina variar entre 16 e 512 $\mu\text{g/ml}$, todas apresentam um padrão de mutações muito idêntico, variando apenas em uma ou duas substituições de aminoácidos. Em cerca de 90% das estirpes produtoras de β -lactamases pertencentes a este grupo estão presentes as substituições Asp350Asn; Met377Ile; Gly490Glu; Val547Ile e Asn569Ser.
- O grupo **IIc** é também caracterizado por uma substituição na posição 502, mas a alanina é substituída por uma treonina (Ala502Thr). Este grupo é constituído por 23 estirpes divididas por 5 padrões mutacionais. Das 23 estirpes, 6 são produtoras de β -lactamase. Assim como as estirpes do grupo mutacional IIb, grande parte das estirpes BLPACR deste grupo apresentam o mesmo padrão mutacional.
- O grupo **IId** é constituído por 10 estirpes divididas por 3 padrões mutacionais e caracterizado pela substituição de uma isoleucina por uma valina, na posição 499 (Ile449Val). Todas as estirpes pertencentes a este grupo são consideradas BLNAR.

Por fim, duas das estirpes estudadas foram incluídas no grupo **III-like** (García-Cobos, 2007) caracterizado pela substituição de uma metionina por uma isoleucina na posição 377 (Met377Ile) e de uma serina por uma treonina na posição 385 (Ser385Thr) não tendo sido encontrada nenhuma estirpe que pertença ao grupo III descrito por Ubukata (Ubukata *et al.*, 2001).

Relação entre os fenótipos de susceptibilidade aos β -lactâmicos e os genótipos de resistência

De acordo com os resultados da sequenciação do gene *ftsI* as estirpes foram organizadas por genótipos (**tabela VII**) (Hotomi *et al.*, 2007).

A prevalência de cada genótipo entre as 240 estirpes estudadas foi a seguinte: 66 (27,5%) não possuíam qualquer mecanismo de resistência à ampicilina, sendo incluídas no genótipo BLNAS. Das 80 estirpes produtoras de β -lactamase, 33 (41,3%) apenas apresentavam este mecanismo de resistência tendo sido incluídas no genótipo BLPAR (TEM-1) e 47 (58,8%) possuíam ambos os mecanismos de resistência, pertencendo assim ao genótipo BLPACR. Noventa e duas (97,9%) das 94 estirpes BLNAR pertenciam ao grupo I e II (genótipo I/II BLNAR) e 2 estirpes foram consideradas III-like (genótipo III-like BLNAR).

Tabela VII - Distribuição das estirpes por genótipos e percentagem de cada genótipo na amostra total.

Genótipo	<i>n</i>	%
gBLNAS	66	27,5
gBLPAR (TEM-1)	33	13,8
I/II gBLPACR	47	19,6
I/II gBLNAR	92	38,3
III-like gBLNAR	2	0,8
Total	240	100

Avaliando a relação entre a CIM à ampicilina e os genótipos obtidos, é possível observar que:

- Dos 66 isolados considerados BLNAS, 29 apresentam mutações no gene *ftsI*, mutações estas que não parecem ter qualquer influência na resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

- Todas as estirpes estudadas com uma CIM à ampicilina igual a 1 µg/ml ($n=42$) apresentam mutações no gene *ftsI*.
- Das 52 estirpes com uma CIM de 2 µg/ml, apenas duas não apresentam qualquer mutação na região codificante da transpeptidase.
- Todas as estirpes com uma CIM à ampicilina maior que 8 µg/ml apresentava pelo menos um dos mecanismos de resistência.

Na **tabela VIII** está representada a relação entre os padrões de susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e os genótipos descritos, assim como as CIMs 50 e 90 para cada genótipo.

Ao analisar a relação entre a susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e os genótipos de resistência observa-se que em relação às estirpes susceptíveis (genótipo BLNAS):

- Há um aumento da CIM₅₀ para todos os β -lactâmicos nas estirpes do genótipo I/II BLNAR, sendo: 8x maior para a ampicilina, cefaclor e cefuroxima; 4x maior para o co-amoxiclave e meropenem; 2x para o cefepime e cefotaxima.
- As estirpes produtoras de β -lactamase apresentam um aumento de mais de 250x da CIM₅₀ à ampicilina nas estirpes BLPAR e de 500x nas estirpes com ambos os mecanismos de resistência (BLPACR), em relação às estirpes BLNAS.
- As estirpes BLPACR apresentam os valores de CIM à ampicilina mais elevados, 128µg/ml e > 256 µg/ml (**figura 10**).
- Estirpes com os genótipos BLNAR e BLPACR, apresentam um certo nível de resistência ao co-amoxiclave (2,2% e 2,1%, respectivamente), provavelmente pelo facto de ambas possuírem mutações no gene *ftsI*.
- Para os restantes β -lactâmicos estudados não se observam diferenças significativas na CIM₅₀ das estirpes do genótipo BLPAR. Nas estirpes do genótipo BLPACR, observa-se um ligeiro aumento da CIM₅₀ para a cefuroxima e meropenem.
- Treze (14%) e vinte e três (25%) das estirpes do genótipo I/II BLNAR apresentam resistência à cefuroxima e ao cefaclor, respectivamente e seis (6,5%) estirpes com este mesmo genótipo não são susceptíveis ao meropenem.
- Todas as estirpes estudadas, são susceptíveis à cefotaxima e apenas uma estirpe é resistente ao cefepime.

Tabela VIII - Distribuição das CIM para os antibióticos β -lactâmicos, segundo os mecanismos de resistência em *H. influenzae*.

Antibiótico	genótipo*	N	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			Susceptibilidade (%)		
			50%	90%	intervalo	S	I	R
Ampicilina	gBLNAS	66	0,25	1	0,12 - 4	92,4	3	4,6
	gBLPAR (TEM-1)	33	64	256	4 - 512	0	0	97
	I/II gBLPACR	47	128	512	8 - >512	0	0	100
	I/II gBLNAR	92	2	2	0,12 - 8	42,4	53,2	4,3
	III-like gBLNAR	2	1	8	1 8	50	0	50
Co-amoxiclave	gBLNAS	66	0,5	1	$\leq 0,25$ - 4	100	0	0
	gBLPAR (TEM-1)	33	2	2	0,5 - 4	94	0	0
	I/II gBLPACR	47	2	4	1 - > 4	97,87	0	2,1
	I/II gBLNAR	92	2	2	$\leq 0,25$ - > 4	97,8	0	2,2
	III-like gBLNAR	2	2	4	2 a 4	100	0	0
Cefepime	gBLNAS	66	$\leq 0,12$	0,25	$\leq 0,12$ - > 2	98,46	1,54	
	gBLPAR (TEM-1)	33	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$ - 0,5	94	0	
	I/II gBLPACR	47	$\leq 0,12$	0,25	$\leq 0,12$ - 1	100	0	
	I/II gBLNAR	92	0,25	0,5	$\leq 0,12$ - 0,5	100	0	
	III-like gBLNAR	2	$\leq 0,12$	0,25	$\leq 0,12$ - 0,25	100	0	
Cefotaxima	gBLNAS	66	$\leq 0,03$	0,06	$\leq 0,03$ - 1	100	0	
	gBLPAR (TEM-1)	33	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$ - 0,06	94	0	
	I/II gBLPACR	47	0,03	0,06	$\leq 0,03$ - 0,25	100	0	
	I/II gBLNAR	92	0,06	0,12	$\leq 0,03$ - 1	100	0	
	III-like gBLNAR	2	0,06	0,12	0,06 - 0,12	100	0	
Cefuroxima	gBLNAS	66	0,5	4	$\leq 0,25$ - >8	91	6,06	3
	gBLPAR (TEM-1)	33	0,5	4	$\leq 0,25$ - >8	91	0	3,03
	I/II gBLPACR	47	2	4	1 - >8	97,9	0	2,1
	I/II gBLNAR	92	4	> 8	$\leq 0,25$ - >8	67,4	18,5	14,1
	III-like gBLNAR	2	4	> 8	4 - >8	50	0	50
Cefaclor	gBLNAS	66	2	16	≤ 1 - >16	87,9	6,06	6,06
	gBLPAR (TEM-1)	33	8	> 16	≤ 1 - >16	66,6	12,12	15,15
	I/II gBLPACR	47	8	> 16	8 - >16	57,44	29,78	12,76
	I/II gBLNAR	92	16	> 16	≤ 1 - > 16	46,7	28,3	25
	III-like gBLNAR	2	16	> 16	16 - >16	0	50	50
Meropenem	gBLNAS	66	$\leq 0,06$	0,12	$\leq 0,06$ - 1	98,5	1,5	
	gBLPAR (TEM-1)	33	$\leq 0,06$	0,12	$\leq 0,06$ - 0,25	94	0	
	I/II gBLPACR	47	0,12	0,25	$\leq 0,06$ - 0,5	100	0	
	I/II gBLNAR	92	0,25	0,5	$\leq 0,06$ - 2	93,5	6,5	
	III-like gBLNAR	2	$\leq 0,06$	1	$\leq 0,06$ - 1	50	50	

* Hotomi *et al.*, 2007

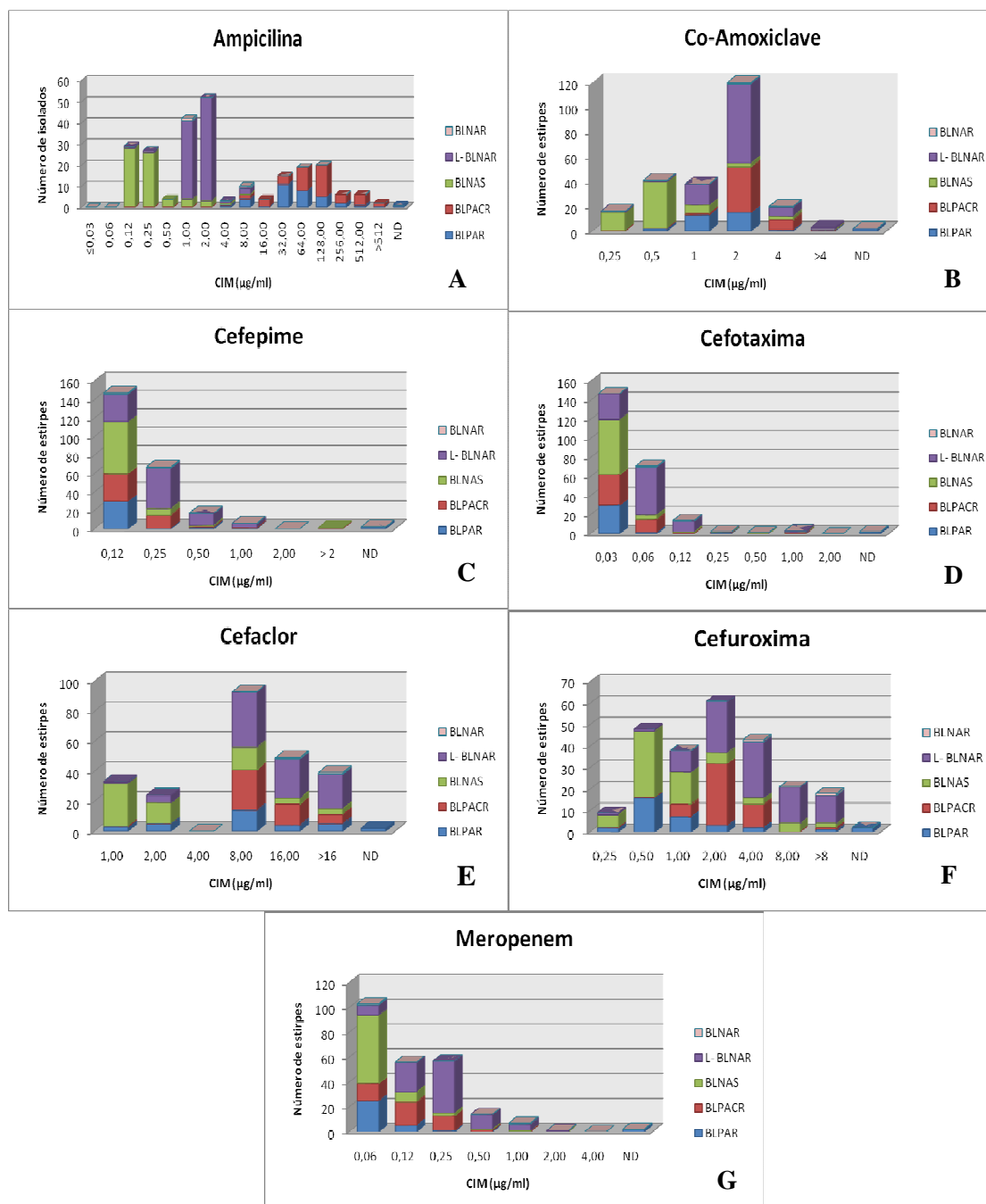


Figura 10 – Representação gráfica da susceptibilidade aos diversos antibióticos β-lactâmicos e a sua relação com o genótipo de resistência. **A** - ampicilina; **B** - co-amoxiclave; **C** - cefepime; **D** - cefotaxima; **E** - cefaclor; **F** - cefuroxima; **G** - meropenem;

Análise dos padrões de macrorestrição SmaI por PFGE

Com o objectivo de estabelecer uma relação genética entre as estirpes que apresentam o mecanismo de resistência não enzimático e a sua disseminação clonal procedeu-se à análise dos padrões de macrorestrição da enzima SmaI por PFGE. A digestão com esta enzima origina perfis de bandas distintos, conforme o número de sequências de reconhecimento em cada estirpe (**figura 11**). Os perfis de restrição obtidos permitem-nos relacionar estirpes com proximidade genética, assim como entender a sua disseminação, através de uma análise comparativa, usando um software informático (*BioNumerics*).

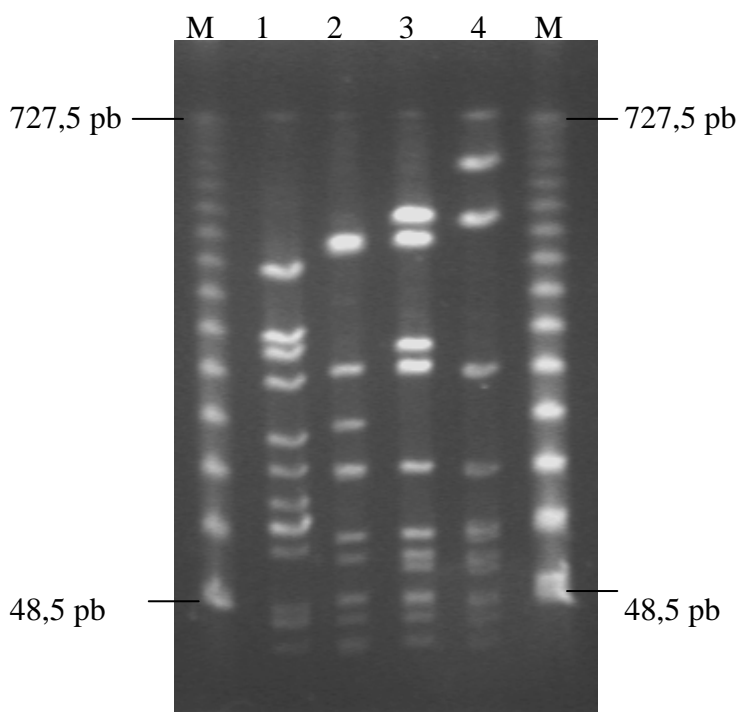


Figura 11 – PFGE em gel de agarose dos fragmentos de DNA cromossómico, originados por macrorestrição com a enzima SmaI. **M** – Lambda-ladder PFG marker; **1 a 4** – DNA padrão de bandas originado pela macrorestrição das estirpes em estudo.

Para esta pesquisa, foram escolhidas aleatoriamente 74 estirpes (31 estirpes do genótipo BLPACR e 43 BLNAR). Destas, 54 estirpes pertencem ao grupo IIb, 13 ao grupo IIc, 5 ao grupo IId e 2 ao grupo III-like.

A análise foi efectuada segundo o coeficiente binário de Dice (S_D), que permite medir a similaridade dos dados de acordo com a existência de bandas iguais. Assim o dendrograma resultante foi obtido com uma optimização de 1,5% e uma tolerância de 1,1%.

As 74 estirpes estudadas foram agrupadas em 30 perfis de PFGE diferentes (**figuras 12 e 13**). Dezassete perfis são constituídos por estirpes isoladas; doze perfis apresentam 2 a 5 estirpes geneticamente relacionadas (> 85% identidade); um dos perfis é constituído por 18 estirpes, todas geneticamente relacionadas, com mais de 90% de identidade.

Decompondo o dendrograma do ponto de vista dos grupos mutacionais, observamos que as 54 estirpes do grupo IIb encontram-se distribuídas por 21 perfis diferentes, havendo *clusters* constituídos apenas por estirpes deste grupo. As estirpes do grupo IIc estão distribuídas por 6 *clusters*, as do grupo IId por 4 e por fim as duas estirpes do grupo III-like encontram-se distribuídas por zonas do dendrograma bastante distintas, não havendo qualquer relação clonal entre elas (**figuras 12 e 13, tabela IX**).

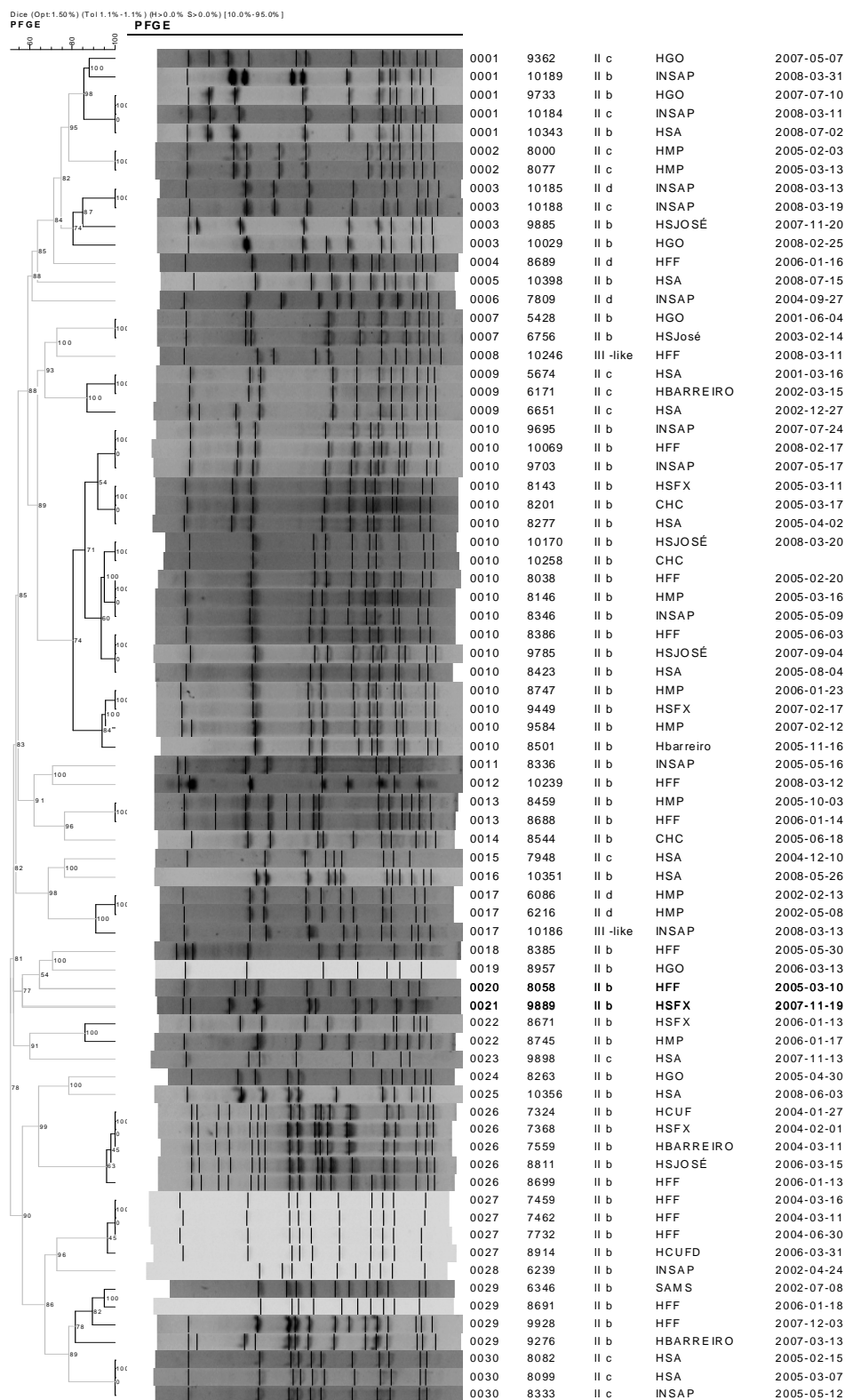


Figura12- Análise evolutiva de algumas das estirpes de *H. influenzae* seleccionadas. O dendrograma UPGMA foi gerado pelo software BioNumerics através da análise dos perfis de PFGE da digestão com SmaI. Junto do dendrograma estão presentes o cluster, a identificação, o grupo mutacional e o local e data de isolamento de cada estirpe. Foram identificados 30 clusters através do método *cluster cut-off* (80%).

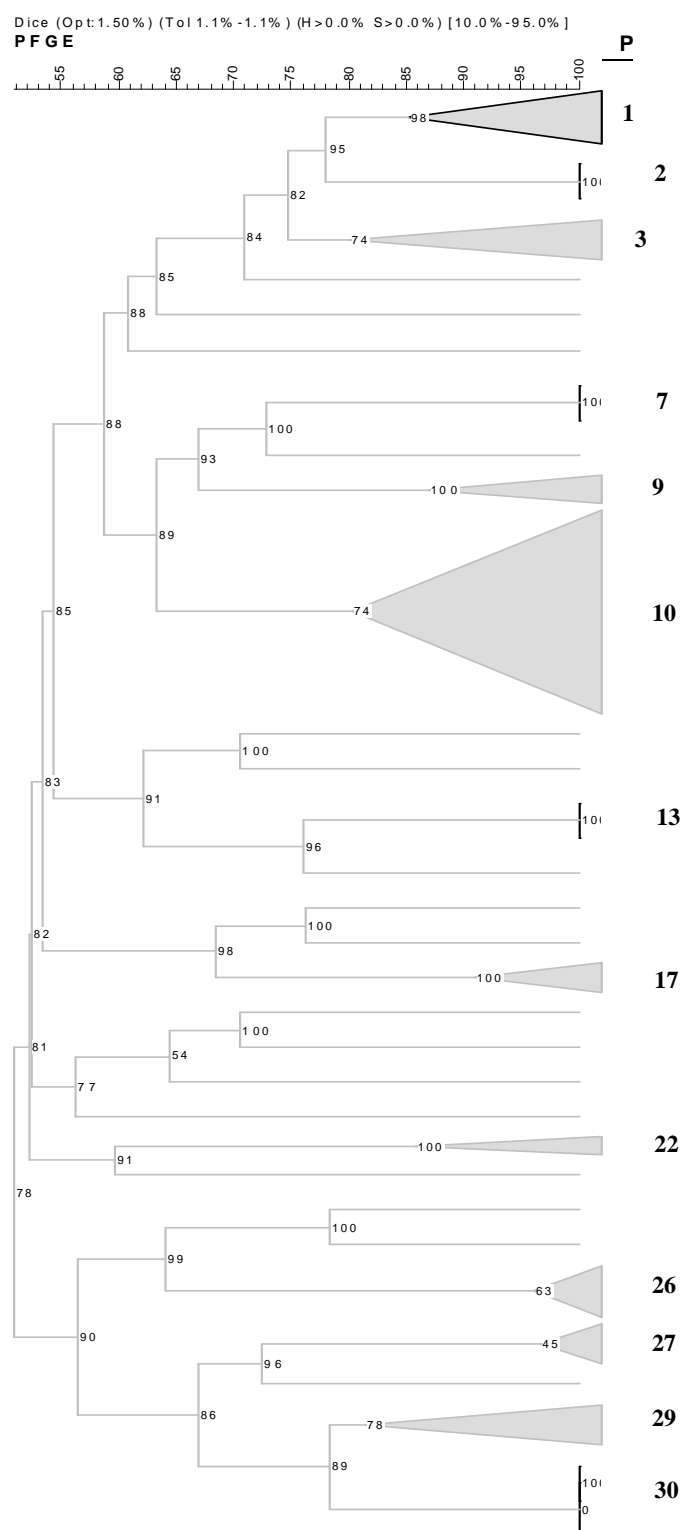


Figura 13 – Dendrograma originado a partir da análise dos perfis de PFGE *SmaI*, obtidos para as várias estirpes. Os clusters maiores foram agrupados de forma a visualizar com mais pormenor as relações entre estirpes.

Tabela IX- Características das estirpes incluídas nos principais perfis originados pela análise dos padrões de macrorestrição da *SmaI*, por PFGE.

Perfil	grupo	estirpe	β -lactamase	CIM amp. (μ g/ml)	Substituições na PBP3											
					Asp 350	Ser 357	Met 377	Ser 385	Ile 449	Gly 490	Ala 502	Arg 517	Asn 526	Thr 532	Val 547	Asn 569
1	II c	Hi 9362	NEG.	2	Asn						Thr		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9733	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II c	Hi 10184	NEG.	1	Asn						Thr		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 10189	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 10343	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
2	II c	Hi 8000	POS.	128	Asn						Thr		Lys		Ile	Ser
	II c	Hi 8077	POS.	128	Asn						Thr		Lys		Ile	Ser
3	II b	Hi 9885	NEG.	1	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 10029	NEG.	1						Glu	Val		Lys		Ile	Ser
	II d	Hi 10185	NEG.	1					Val				Lys		Ile	Ser
	II c	Hi 10188	NEG.	1	Asn						Thr		Lys		Ile	Ser
7	II b	Hi 5428	NEG.	2	Asn		Ile			Glu	Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 6756	NEG.	2	Asn		Ile			Glu	Val		Lys		Ile	Ser
9	II c	Hi 5674	NEG.	2							Thr		Lys		Ile	Ser
	II c	Hi 6171	NEG.	2							Thr		Lys		Ile	Ser
	II c	Hi 6651	NEG.	2							Thr		Lys		Ile	Ser
10	II b	Hi 8038	POS.	32	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8143	POS.	64	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8146	POS.	128	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8201	POS.	256	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8277	POS.	128	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8346	POS.	256	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8386	POS.	128	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8423	POS.	128	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8501	POS.	256	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8747	POS.	256	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9449	POS.	>8	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9584	POS.	64	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9695	POS.	128	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9703	POS.	64	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9785	POS.	128	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 10069	POS.	64	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 10170	POS.	64	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 10258	POS.	128	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
13	II b	Hi 8459	POS.	32	Asn		Ile			Glu	Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8688	POS.	128	Asn		Ile			Glu	Val		Lys		Ile	Ser
17	II d	Hi 6086	NEG.	2					Val				Lys		Ile	Ser
	II d	Hi 6216	NEG.	2					Val				Lys		Ile	Ser
	III	Hi 10186	NEG.	8	Asn	Asn	Ile	Thr				His		Ser	Ile	
22	II b	Hi 8671	POS.	512	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8745	NEG.	1	Asn		Ile			Glu	Val		Lys		Ile	Ser
26	II b	Hi 7324	NEG.	2						Glu	Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 7368	NEG.	2						Glu	Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 7559	NEG.	2						Glu	Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8811	NEG.	2						Glu	Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8699	NEG.	2						Glu	Val		Lys		Ile	Ser
27	II b	Hi 7459	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 7462	NEG.	1	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 7732	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8914	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
29	II b	Hi 6346	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 8691	NEG.	1			Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9928	NEG.	1	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
	II b	Hi 9276	NEG.	2	Asn		Ile				Val		Lys		Ile	Ser
30	II c	Hi 8082	POS.	512	Asn						Thr		Lys		Ile	Ser
	II c	Hi 8099	POS.	>512							Thr		Lys		Ile	Ser
	II c	Hi 8333	POS.	> 512	Asn						Thr		Lys		Ile	Ser

Em relação aos principais perfis electroforéticos obtidos, descritos na **tabela XI**:

O **perfil 1** consiste em 5 estirpes provenientes de 3 hospitais (dois da grande Lisboa (HGO, HSA) e um do Porto (INSAP)), isoladas entre Maio de 2007 e Julho de 2008. Apesar das estirpes deste *cluster* serem de grupos mutacionais diferentes (IIb e IIc) todas partilham as substituições aminoacídicas: D350N; N526K, V547I e N569S, variando apenas na posição 377, uma vez que as estirpes do grupo IIc, não apresentam qualquer mutação nesta posição. Todas, com excepção da estirpe Hi10184, possuem uma CIM à ampicilina de 2 µg/ml. As estirpes Hi9733; Hi10184 e Hi10343 possuem exactamente o mesmo perfil de PFGE. As restantes estirpes deste perfil (Hi9362, Hi10189) variam entre si apenas numa banda. Em relação às outras 3 estirpes há uma variação de duas bandas, podendo ainda estar relacionadas entre si, segundo o critério de Tenover (Tenover *et al*, 1995).

O **perfil 2** é constituído por duas estirpes com 100% de identidade, isoladas em crianças de 2 anos idade, no mesmo hospital (HMP), com uma diferença de um mês entre os isolamentos. Ambas as estirpes são produtoras de β -lactamase, com uma CIM à ampicilina de 128 µg/ml e estão inseridas no grupo mutacional IIc, apresentando o mesmo padrão mutacional: D350N; A502T, N526K, V547I e N569S.

O **perfil 3** é caracterizado por 4 estirpes isoladas em 3 hospitais (dois da grande Lisboa (HSJosé, HGO) e um do grande Porto (INSAP)). Todas as estirpes incluídas neste *cluster* apresentam uma CIM à ampicilina de 1 µg/ml. As duas estirpes isoladas no INSAP, apenas com dois meses de intervalo, possuem um perfil de PFGE 100% idêntico. Contudo, estas duas estirpes não apresentam o mesmo perfil mutacional, estando mesmo incluídas em grupos diferentes (IIId e IIc). As únicas substituições aminoacídicas que apresentam em comum são: N526K, V547I e N569S. As outras duas estirpes pertencentes a este *cluster*, apesar de estarem incluídas no mesmo grupo mutacional (IIb) não apresentam o mesmo perfil de mutações.

O **perfil 7** é caracterizado por duas estirpes com 100% de identidade, isoladas em dois hospitais da grande Lisboa (HSJosé e HGO). Uma das estirpes foi isolada de uma infecção ocular numa criança e a outra estirpe foi isolada dois anos mais tarde de um adulto com meningite. Ambas as estirpes apresentam uma CIM à ampicilina de 2 µg/ml e pertencem ao grupo mutacional IIb, partilhando o mesmo padrão de mutações: D350N; M377I; G490E; A502V; N526K; V547I; N569S.

O **perfil 9** é constituído por 3 estirpes isoladas em dois hospitais (1 da zona da grande Lisboa (HBarreiro) e 2 no Porto (HSA), em 2001 e 2002). Todas as estirpes apresentam uma CIM à ampicilina de 2 µg/ml e pertencem ao grupo IIc, apresentado o mesmo padrão de mutações: A502T, N526K, V547I e N569S. As estirpes Hi5679 (HSA) e Hi6171 (Hbarreiro) são 100% homólogas e foram isoladas com um ano de diferença, ambas em crianças com menos de um ano de idade.

O **perfil 10** é constituído por 18 estirpes, isoladas entre 2005 e 2008 em 8 hospitais (INSAP, HFF, HSFX, CHC, HSA, HSJosé, HMP, HBarreiro). Todas as estirpes que constituem este cluster são produtoras de β-lactamase e estão inseridas no grupo mutacional IIb, partilhando o mesmo padrão de substituições aminoacídicas: D350N; M377I; A502T; N526K; V547I e N569S. A CIM destas estirpes à ampicilina varia entre 32 µg/ml e 256 µg/ml.

O **perfil 13** é constituído por duas estirpes com 100% de identidade entre si, provenientes de dois hospitais (um da grande Lisboa (HFF) e outro do grande Porto (HMP)), isoladas no fim de 2005 e início de 2006, respectivamente. Ambas as estirpes são produtoras de β-lactamase, pertencentes ao grupo IIb e partilham o mesmo padrão mutacional: D350N; M377I; G490E; A502V; N526K; V547I; N569S.

O **perfil 17** é caracterizado por três estirpes. Duas das estirpes apresentam 100% de similaridade e foram isoladas em 2002 no hospital HMP, com uma diferença de 3 meses entre os isolamentos. Ambas as estirpes têm uma CIM à ampicilina de 2 µg/ml e pertencem ao grupo mutacional IId, partilhando o padrão mutacional: I449V; N526K; V547I; N569S. A restante estirpe incluída neste *cluster* tem 85% de identidade com as restantes, diferindo em duas bandas no padrão de PFGE e está incluída no ao grupo mutacional III-like. Foi isolada no INSAP em 2008.

O **perfil 22** é constituído por duas estirpes, ambas isoladas em Janeiro de 2001 em hospitais pediátricos, um em Lisboa e o outro no Porto (HSFX, HMP). Apesar de estarem no mesmo *cluster* e pertencerem ao mesmo grupo mutacional, estas estirpes partilham apenas 85% de identidade.

O **perfil 26** é constituído por 5 estirpes isoladas na zona da grande Lisboa (HCUF, HSFX, HBarreiro, HSJosé e HFF). Dessas, três estirpes apresentam um perfil de PFGE com 100% de identidade e foram isoladas no ano de 2004, com mais ou menos um mês de

diferença entre isolamentos. As restantes duas estirpes foram isoladas no ano de 2006, com dois meses de diferença entre isolamentos e diferem entre si apenas numa banda. Todas as estirpes deste *cluster* apresentam uma CIM à ampicilina de 2 µg/ml e pertencem ao grupo mutacional IIb partilhando o padrão mutacional: G490E; A502V; N526K; V547I; N569S.

O **perfil 27** é caracterizado por 4 estirpes isoladas na zona da grande Lisboa (HFF e HCUFD). Três destas estirpes apresentam um perfil 100% idêntico e são provenientes do mesmo hospital (HFF). Estas 3 estirpes foram todas isoladas no mesmo ano com apenas algumas semanas de intervalo. A quarta estirpe possui 98% de identidade com as restantes estirpes deste grupo e foi isolada em 2006. Todas as estirpes deste *cluster* pertencem ao grupo mutacional IIb e apresentam o mesmo padrão mutacional: D350N; M377I; A502V N526K; V547I; N569S.

O **perfil 29** é caracterizado por 4 estirpes, todas isoladas na zona da grande Lisboa (HFF, SAMS, HBarreiro), entre 2002 e 2007. Todas as estirpes deste *cluster* pertencem ao grupo mutacional IIb e apresentam o mesmo padrão mutacional: D350N; M377I; A502V N526K; V547I; N569S, com a exceção da estirpe Hi8691 que não apresenta nenhuma substituição aminoacídica na posição 350.

Por fim, o **perfil 30** é constituído por 3 estirpes, todas isoladas na zona do grande Porto (HSA e INSAP) no primeiro semestre de 2005. Estas estirpes apresentam 100% de identidade. Todas as estirpes deste *cluster* são positivas para a produção de β-lactamase e apresentam um CIM à ampicilina de ≥ 512 µg/ml. As 3 estirpes estão incluídas no padrão mutacional IIc e partilham as seguintes mutações: A502T; N526K; V547I; N569S. A mutação D350N apenas aparece em duas das estirpes.

Discussão

Susceptibilidade aos antibióticos

Analisando as taxas de resistência aos 13 agentes antimicrobianos obtidas neste estudo (**tabela IV**) observamos que as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (cefotaxima e cefepime), a ciprofloxacina, o cloranfenicol, a tetraciclina e a rifampicina apresentam boa actividade *in vitro* contra as estirpes de *H. influenzae* estudadas. Pelo contrário, apenas 62,5%, 67,5% e 82,9% das estirpes são susceptíveis ao cefaclor, ao SXT e à cefuroxima, respectivamente. Estes antibióticos não devem, assim, ser utilizados em casos de infecções graves a *H. influenzae*, como sejam, por exemplo, as infecções invasivas. No entanto, sabemos que hoje em dia, em Portugal, para as infecções desta natureza está instituída a utilização das cefalosporinas de 3ª geração, como tratamento de 1ª linha. Em relação ao cloranfenicol e à tetraciclina a percentagem de estirpes resistentes a estes antibióticos era elevada, principalmente, na década de 80 e 90. Pensamos que o facto destes antibióticos já não serem utilizados na terapia das infecções a *H. influenzae* terá contribuído para a ausência de estirpes resistentes nos últimos anos.

Anteriormente à utilização da vacina para Hib a percentagem de estirpes multirresistentes (resistência a 3 ou mais classes de antibióticos) era bastante elevada, principalmente entre as estirpes do serótipo b. A eficácia da vacina e a diminuição drástica de infecções por estirpes deste serótipo, levou a que o fenótipo de multiresistência seja, hoje em dia, praticamente inexistente. Esta realidade foi confirmada por Bajanca e colaboradores num estudo que demonstra a diminuição da multiresistência como reflexo do declínio de estirpes Hib, em Portugal. Nesse estudo observou-se uma diminuição da multiresistência em estirpes Hib de 40% em 1989 para 0% em 1996 (Bajanca *et al.*, 2004). Na amostra estudada e de acordo com o que se tem observado nos últimos anos, não foi identificada nenhuma estirpe multirresistente.

Este estudo mostrou uma elevada associação entre a resistência à ampicilina e a resistência às cefalosporinas, essencialmente as de 2ª geração, o que parece estar directamente relacionado com o mecanismo de resistência associado a modificações na PBP3 aqui estudado. O excessivo consumo de antibióticos no nosso país pode também contribuir para estes resultados. Dados semelhantes têm sido descritos em estirpes BLNAR isoladas em

países como Espanha, EUA e Canadá (Kaczmarek *et al.*, 2004; García-Cobos *et al.*, 2007; Shuel e Tsang, 2009).

No caso particular de Espanha, para além da elevada resistência à ampicilina que aí se verifica, é o país da Europa que apresenta as maiores taxas de resistência aos antibióticos, em *H. influenzae*. Este facto parece estar relacionado com o elevado consumo de antibióticos neste país (Campos *et al.*, 2004).

Cápsula

A pesquisa de cápsula foi efectuada através da amplificação do gene *bexA* por PCR, uma vez que, como já foi demonstrado, os métodos moleculares dão origem a resultados com maior precisão e sensibilidade (LaClaire *et al.*, 2003). *H. influenzae* só apresenta cápsula quando há expressão dos genes responsáveis pela sua produção. Estes genes estão localizados no *locus cap* que consiste em 3 regiões funcionais: I, II e III, constituídas por diversos genes e ORFs. Todos os seis serótipos (a a f) partilham a organização das regiões I e III, que contêm a informação necessária para o processamento e transporte do material da cápsula; a região 2 está envolvida na biossíntese da cápsula e é constituída por genes que parecem ser únicos para cada tipo capsular (Falla *et al.*, 1994; Satola *et al.*, 2003, Satola *et al.*, 2003b). Esta organização permitiu assim o desenvolvimento de técnicas de PCR específicas para distinguir as estirpes capsuladas das estirpes NC, assim como para a identificação de cada um dos seis serótipos (Falla *et al.*, 1994).

Ao analisar os resultados da pesquisa e caracterização da cápsula nas estirpes de *H. influenzae* estudadas, verificamos que 99,6% (n=239) das estirpes são NC, tendo sido apenas caracterizada uma estirpe capsulada e de serótipo b. Como foi referido por Bajanca e colaboradores (Bajanca *et al.*, 2004) a introdução da vacina em Portugal levou a um declínio das estirpes Hib, de 81% para 16%, e a um aumento das estirpes NC, de 19% para 80% (entre 1989 e 2001). Na nossa amostra verificámos que a percentagem das estirpes não capsuladas atinge praticamente os 100%. Mesmo as estirpes invasivas isoladas no nosso laboratório que até 2004 eram essencialmente do serótipo b são, hoje em dia, na sua maioria NC (dados não publicados). Este trabalho, parece reflectir essa realidade uma vez que todas as estirpes invasivas caracterizadas são NC.

Apesar de este estudo não nos permitir tirar conclusões acerca do serótipo capsular na generalidade das estirpes isoladas em Portugal, tem-se observado em estudos de vigilância realizados no nosso laboratório, uma emergência de estirpes de serótipo-não-b. Assim, entre as estirpes invasivas isoladas entre 2001 e 2008, inclusive, já foram identificadas 6 estirpes de serótipo **f** e 3 de serótipo **a** (Lavado, 2009). Estes dados são semelhantes aos observados nos outros países, onde a vacina conjugada também já foi implementada, verificando-se uma diminuição drástica da doença invasiva a Hib. Estudos realizados em Espanha e Itália têm caracterizado estirpes de serótipo-não-b, nomeadamente **a**, **e** e **f** (Campos *et al.*, 2004; Cerquetti *et al.*, 2004). Por outro lado no Japão, país onde a vacina ainda não foi implementada, a incidência de estirpes do serótipo **b**, é bastante elevada, observando-se mesmo um maior nível de resistência nas estirpes BLNAR deste serótipo (Hasegawa *et al.*, 2004).

Genes responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos

As alterações que se têm vindo a observar, nos últimos anos, na ecologia desta espécie, essencialmente devido à introdução da vacina Hib, têm sido acompanhadas por uma mudança nos fenótipos de resistência, principalmente no aumento significativo dos fenótipos BLNAR e BLPACR.

1. Resistência mediada pela produção de β -lactamase

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *H. influenzae* é, com mais frequência, mediada pela produção da enzima β -lactamase, sendo esta frequentemente do tipo TEM. Num estudo em que se caracterizou a enzima responsável pela resistência à ampicilina, em 2225 estirpes produtoras de β -lactamase, isoladas entre 1999 e 2003, em diversos países (PROTEKT) verificou-se que a prevalência de enzimas do tipo TEM-1 e ROB-1, em isolados de *H. influenzae* era de 93,7% e 4,6%, respectivamente (Farrell *et al.*, 2005). Neste estudo observou-se uma prevalência mais elevada de estirpes com a enzima ROB-1 na América do Norte (Canadá, México, EUA) do que na Europa e no Japão (Farrell *et al.*, 2005; García-Cobos *et al.*, 2008; Hotomi *et al.*, 2006; Harimaya *et al.*, 2008).

Em determinados países, como é o caso de Espanha e Japão, a percentagem de estirpes produtoras de β -lactamase tem vindo a diminuir na última década (García-Cobos *et al.*, 2008, Hasegawa *et al.*, 2004). Em Espanha, por exemplo, entre os anos 1997 e 2007, observou-se

uma diminuição de 15,5% de isolados produtores de β -lactamase (García-Cobos *et al.*, 2008). Uma vez que a amostra deste estudo não foi escolhida aleatoriamente não nos é possível fazer uma comparação no que diz respeito à prevalência anual de estirpes produtoras de β -lactamase. No entanto, dados do nosso laboratório mostram também uma ligeira diminuição das estirpes com este mecanismo de resistência.

Para a caracterização deste mecanismo estudámos 80 estirpes (33% do total da amostra) produtoras de β -lactamase, tendo-se amplificado o gene *bla*_{TEM} em todas as estirpes. Destas 80 estirpes, 55 (68,7%) apresentavam mutações diversas no gene *ftsI*, mas apenas 47 (58,8%) apresentavam mutações associadas ao mecanismo de resistência não enzimático - BLPACR. Estes valores são muito idênticos aos encontrados em Espanha (García-Cobos *et al.*, 2007; Sevillano *et al.*, 2009) e França (Dabernat *et al.*, 2002; Dabernat *et al.*, 2003) e bastante superiores aos encontrados em vários estudos realizados no Japão, onde a percentagem de estirpes produtoras de β -lactamase é muito baixa (Hasegawa *et al.*, 2004; Sanbongi *et al.*, 2006; Harimaya *et al.*, 2008)

2. Resistência mediada por alterações nas PBP3

Estirpes BLNAR foram descritas pela primeira vez em 1974 por Thornsberry e Kirven, quando avaliavam um teste rápido para a determinação da produção de β -lactamase (revisto em Tristam *et al.*, 2007), não tendo sido, naquela altura, as estirpes deste fenótipo consideradas um problema clínico importante. Em 1984, Mendelman e colaboradores sugeriram que a resistência destas estirpes à ampicilina era devida a uma diminuição da afinidade de algumas PBPs para este antibiótico. Em 1987, confirmaram que a afinidade das PBPs 2, 3 A, 3 B e/ou 4 para a ampicilina estava reduzida em estirpes BLNAR (Mendelman *et al.*, 1984; Mendelman *et al.*, 1987). Esta relação entre a alteração das PBPs e a resistência à ampicilina foi confirmada por Parr e Bryan, ao transformar estirpes susceptíveis com DNA cromossómico de estirpes BLNAR (Tristam *et al.*, 2007). Apesar destas constatações, apenas em 2001 Ubukata e colaboradores estudaram, pela primeira vez, as mutações específicas na região codificante da transpeptidase do gene que codifica as PBP3, que originam substituições aminoacídicas na transpeptidase levando à diminuição de afinidade para este antibiótico (Dabernat *et al.*, 2002; Hasagawa *et al.*, 2004; García-Cobos *et al.*, 2007). Estas substituições aminoacídicas, têm sido, desde então, relacionadas com a resistência a alguns dos antibióticos β -lactâmicos (Tristam *et al.*, 2007). Segundo estudos realizados em diversos países, desde a

Europa até aos EUA e Japão, este tipo de resistência parece ser condicionado por uma única ou por múltiplas substituições aminoacídicas em posições específicas da proteína PBP3 (Ubukata *et al.*, 2001; Dabernat *et al.*, 2002; Matic *et al.*, 2003; Osaki *et al.*, 2005; Sanbongi *et al.*, 2006; García-Cobos *et al.*, 2007).

Em estudos realizados em Espanha e França, estirpes BLNAR foram classificadas em apenas dois dos grupos mutacionais definidos por Ubukata, de acordo com a presença das substituições Arg517His (grupo I) e Asn526Lys (grupo II) originadas por mutações pontuais no gene *ftsI* (Dabernat *et al.*, 2002; García-Cobos *et al.*, 2008). No Japão, para além da presença das duas substituições referidas, uma grande percentagem de estirpes apresenta em simultâneo as substituições Met377Ile, Ser385Thr e Leu389Phe, para além da substituição Asn526Lys, dando origem ao grupo III sugerido por Ubukata (2001). Todavia, na maioria dos trabalhos realizados na Europa, EUA, Coreia e Canadá, apesar da substituição Met377Ile ser caracterizada com frequência, a combinação mutacional que caracteriza o grupo III é praticamente inexistente (Dabernat *et al.*, 2002; Kaczmarek *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Shuel e Tsang, 2009). Neste trabalho, não foram caracterizadas estirpes apresentando o conjunto das três mutações, tendo sido apenas caracterizadas duas estirpes com as substituições Met377Ile e Ser385Ile, em simultâneo. Apesar da presença destas duas mutações não ser suficiente para as classificar no grupo III, estas estirpes foram incluídas no grupo III-like, tal como sugerido por García-Cobos e colaboradores (García-Cobos *et al.*, 2007).

A nossa amostra foi assim dividida em três grupos e 4 subgrupos, seguindo as classificações sugeridas por Ubukata, Dabernat e García-Cobos (Ubukata *et al.*, 2001; Dabernat *et al.*, 2002; García-Cobos *et al.*, 2007). A maioria das estirpes BLNAR estudadas no nosso trabalho foram incluídas no grupo mutacional II, sendo este, assim, o grupo mais comum com 89 (37,1%) das estirpes. Dentro do grupo II, o subgrupo com mais estirpes foi o grupo IIb, caracterizado por 55 estirpes (61,8%). O grupo IIb foi, também, o grupo mais caracterizado na maioria dos estudos realizados sobre este tema nos outros países (Dabernat *et al.*, 2002; Kaczmarek *et al.*, 2004; García-Cobos *et al.*, 2008; Shuel e Tsang, 2009). Mesmo no Japão, onde, devido aos elevados níveis de resistência, o grupo III é caracterizado com frequência, o grupo IIb é, na maioria dos estudos, o mais comum (Hasewaga *et al.*, 2004; Sanbongi *et al.*, 2006; Harimaya *et al.*, 2008).

No nosso trabalho verificámos que a substituição Asn526Lys está presente em 137 estirpes (57,1%), resultados que são consistentes com estudos realizados na Europa e América do Norte, onde também esta mutação está entre as mais comuns (Dabernat *et al.*, 2002; Kaczmarek *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; García-Cobos *et al.*, 2008; Sevillano *et al.*, 2009; Shuel e Tsang, 2009).

Para além da substituição Asn526Lys, as substituições aminoacídicas Val547Ile e Asn569Ser estão também presentes em mais de metade das estirpes estudadas (62,5% e 56,3%, respectivamente). Segundo os resultados obtidos apesar de estas mutações não definirem um grupo mutacional específico, parecem ter algum efeito na resistência não enzimática para alguns antibióticos β -lactâmicos. Na literatura, a região da transpeptidase das PBP3 estudada não contempla, na maioria dos casos, os aminoácidos das posições 547 e 549. Assim, mutações nestas posições foram apenas caracterizadas no Japão, em Itália e no Canadá, não sendo no entanto, observadas com tanta frequência (Matic *et al.*, 2003; Osaki *et al.*, 2005; Kubota *et al.*, 2006; Cerquetti *et al.*, 2007; Shuel e Tsang, 2009).

Como já foi referido, as estirpes BLPACR são muito raras no Japão, contrastando com a elevada percentagem de estirpes BLNAR. No nosso estudo foram caracterizadas 47 (19,6%) estirpes BLPACR, que apresentam os dois mecanismos de resistência, estando todas incluídas no grupo mutacional II. Estes valores são muito idênticos aos encontrados em Espanha, onde num estudo recente, 22% da amostra foi caracterizada como BLPACR (Sevillano *et al.*, 2009). É de notar que, neste estudo, a maioria das estirpes BLPACR pertencem ao grupo IIb (n=40) apresentando em comum, salvo raras exceções, as substituições: Asp350Asn; Met377Ile; Ala502Val; Asn526Lys; Val547Ile e Asn569Ser. No estudo de Sevillano e colaboradores, estas estirpes também apresentavam em comum as mutações Met377Ile; Asn502Val, Asn526Lys, sugerindo, mais uma vez, que estas mutações podem estar relacionadas com a resistência não enzimática aos β -lactâmicos.

Relação entre os fenótipos de susceptibilidade aos β -lactâmicos e os genótipos de resistência.

Segundo o CLSI (2009), os *breakpoints* para a ampicilina, definidos para classificar as estirpes nas diferentes categorias de susceptibilidade são, como já referimos:

- $\text{CIM} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ - susceptíveis
- $\text{CIM} = 2 \mu\text{g/ml}$ - de resistência intermédia
- $\text{CIM} \geq 4 \mu\text{g/ml}$ - resistentes.

Segundo este critério, estirpes com uma CIM à ampicilina $< 2 \mu\text{g/ml}$ são consideradas totalmente susceptíveis a este antibiótico. No entanto, verificámos que todas as estirpes não produtoras de β -lactamase com uma CIM à ampicilina $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, por nós caracterizadas, apresentam mutações no gene *ftsI*.

Apenas com estudos moleculares que permitem caracterizar estas mutações é possível detectar a existência do mecanismo de resistência não mediado pelas β -lactamases, uma vez que, baseado nos *breakpoints* para a ampicilina todas estas estirpes são consideradas susceptíveis a este antibiótico. Tal como acontece neste trabalho, estirpes estudadas no Canadá, Espanha e mesmo no Japão, apresentando CIMs com valores intermédios ou susceptíveis ($1 \mu\text{g/ml}$) à ampicilina foram consideradas BLNAR (García-Cobos *et al.*, 2007; Harimaya *et al.*, 2008; Shuel e Tsang, 2009).

Num estudo efectuado em 2001, onde foram testados 4 diferentes métodos e 8 tipos de meio de cultura para identificação das estirpes BLNAR, foi demonstrado que apenas 5 a 50% destas estirpes são detectadas em testes de rotina para a determinação de susceptibilidade aos antibióticos (Barry *et al.*, 2001).

Este e outros estudos sugerem a necessidade da implementação de novos métodos rápidos e eficazes de detecção destas estirpes, assim como de uma revisão dos *breakpoints* em vigor.

Em relação às estirpes BLPACR, o facto de num primeiro *screening* de resistência à ampicilina estas apresentarem resistência devido à produção de β -lactamase, leva a que a presença do mecanismo de resistência devido a alterações nas PBP3 possa ser subestimada. Neste trabalho a amplitude de CIMs para estas estirpes variou entre $8 \mu\text{g/ml}$ a $512 \mu\text{g/ml}$, apresentando na generalidade, uma CIM_{90} à ampicilina mais alta ($512 \mu\text{g/ml}$) do que as estirpes BLPAR ($256 \mu\text{g/ml}$). Estes dados sugerem assim, que a presença de ambos os

mecanismos de resistência diminui a susceptibilidade das estirpes de *H. influenzae* à ampicilina. Apesar de noutros países não existirem muitos estudos sobre esta diminuição de susceptibilidade, há trabalhos que referem diferenças nas CIMs das estirpes BLPACR em comparação com as estirpes BLPAR, tanto para a ampicilina como para a amoxicilina (Matic *et al.*, 2003; Shuel e Tsang., 2009).

Para além da relação entre a resistência à ampicilina e as modificações no gene *ftsI*, a susceptibilidade aos outros β -lactâmicos também parece ser influenciada por mutações neste gene, tendo sido já descrita a relação entre certas mutações e os fenótipos de resistência aqui descritos.

Alguns ensaios de recombinação demonstraram que as mutações Ala502Val e Asn526Lys, estão associadas à resistência ao cefaclor (Osaki, *et al.*, 2005). Os dados obtidos neste trabalho, estão de acordo com esses resultados, uma vez que as estirpes do genótipo I/II BLNAR apresentam a percentagem mais elevada de resistência (R+I = 53,3%) a este antibiótico, não havendo mesmo estirpes sem mutações no gene *ftsI*.

A produção de β -lactamase, indicativa de resistência enzimática à ampicilina, não confere resistência às cefalosporinas. No entanto, caracterizámos 5 estirpes (27,3%) com o genótipo BLPAR resistentes ao cefaclor. Estas estirpes apenas apresentam as substituições Val547Ile e Asn569Ser sugerindo que estas substituições aminoacídicas podem estar relacionadas com o mecanismo de resistência não enzimático a este antibiótico. Para além de uma estirpe (3%) resistente à cefuroxima, as estirpes BLPAR não apresentam resistência a mais nenhuma das cefalosporinas estudadas. A resistência ao cefaclor é ainda observada em 20 estirpes (42,5% (R+I)), num total de 47 que pertencem ao genótipo BLPACR; todas estas estirpes apresentam as substituições Ala502Val; Asn526Lys; Val547Ile e Asn569Ser.

Apesar de ainda não ter sido descrito, no nosso trabalho observámos que estirpes que apresentam as substituições Val547Ile e Asn569Ser, apresentam valores de CIM mais elevados ao cefaclor. Este facto foi observado tanto para estirpes pertencentes a grupos mutacionais previamente definidos, como para estirpes que não estão incluídas em nenhum genótipo de resistência, reforçando a ideia de que estas duas mutações podem estar directamente relacionadas com a resistência ao cefaclor.

Estirpes produtoras de β -lactamase são susceptíveis ao co-amoxiclave, uma vez que o inibidor (ácido clavulânico), é eficaz na inactivação da enzima. Contudo o ácido clavulânico

não tem actividade nas estirpes BLNAR, pois estas não são produtoras de β -lactamase, observando-se iguais valores de CIM tanto para a ampicilina como para o co-amoxiclave. Entre as estirpes com genótipos caracterizados pela presença de mutações no gene *ftsI*, BLNAR e BLPACR, 2,2% e 2,1% de estirpes não são susceptíveis ao co-amoxiclave, respectivamente. Estudos anteriores sugeriram que a diminuição de susceptibilidade a este antibiótico, nas estirpes BLPACR, podia estar relacionada com a presença de ESBLs. Contudo, em 2003, Matic e colaboradores demonstraram que a diminuição de susceptibilidade ao co-amoxiclave estava afinal associada à presença de mutações na PBP3 (Matic *et al.*, 2003).

No que diz respeito ao carbapenem testado neste trabalho, o meropenem, estudos anteriores demonstram a associação da substituição Asn526Lys com a resistência a este antibiótico (Sanbongi *et al.*, 2006).

Apesar de esta ser a mutação mais comum entre as estirpes do nosso estudo, é de notar que apenas 6 de 136 estirpes com esta mutação apresentam uma CIM ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ para o meropenem, não podendo neste caso, esta mutação ser directamente associada à resistência a este antibiótico. Para além da substituição Asn526Lys, não existe nenhuma mutação no gene *ftsI* que seja comum a todas as 6 estirpes, não sendo possível estabelecer qualquer relação entre a diminuição de susceptibilidade ao meropenem e modificações neste gene. Cerquetti e colaboradores encontraram uma relação entre a substituição Asn526Lys e a resistência a outro carbapenem, o imipenem. Nesse estudo foram encontradas subpopulações em duas estirpes de *H. influenzae*, resistentes ao imipenem que partilhavam o padrão mutacional: Asn350Asp; Met377Ile; Als502Val; Asn526Lys; Val547Ile e Asn569Ser. Foram efectuados estudos de transformação com o gene *ftsI* das estirpes com resistência ao imipenem, que resultaram no aumento da CIM para este antibiótico na estirpe transformada (Cerquetti *et al.*, 2007). Apesar de este padrão mutacional ser o mais comum entre as estirpes estudadas neste trabalho, não encontrámos nenhuma relação com a resistência ao meropenem. Em 2005, também Osaki e colaboradores associaram a substituição Asn526Lys com a resistência ao imipenem, mas, tal como nós, não observaram mudanças significativas na resistência ao meropenem (Osaki *et al.*, 2005).

Disseminação Clonal

A elevada heterogeneidade genética de *H. influenzae* NC já foi reportada em diversos trabalhos (Dabernat *et al.*, 2003; García-Cobos *et al.*, 2007; Sunakawa *et al.*, 2007; Sevillano *et al.*, 2009). No nosso estudo, estirpes BLNAR pertencentes aos grupos I Ib, I Ic e I Id estão distribuídas, na sua maioria, ao longo do dendrograma resultante do PFGE. Estes resultados sugerem que, assim como aconteceu em estudos anteriores, também na nossa amostra, as estirpes estudadas, apesar de possuírem substituições aminoacídicas idênticas, apresentam heterogeneidade genética. Este facto sugere que as mutações no gene *ftsI* associadas com o mecanismo de resistência não mediado pelas β -lactamases, estabeleceram-se independentemente em diferentes estirpes BLNAR, em vez de existir uma expansão clonal.

No entanto, segundo a definição de clonalidade sugerida por Dabernat (2002), algumas das estirpes estudadas aparentam uma origem clonal, uma vez que, para além de apresentarem o mesmo perfil de PFGE, apresentam o mesmo padrão mutacional (perfis 2; 7; 13- **figura 13**). De qualquer forma estes perfis são constituídos apenas por duas estirpes, não sendo só por si indicativo de uma disseminação clonal.

Ao contrário do que acontece com as estirpes BLNAR, as estirpes BLPACR aqui estudadas parecem apresentar uma disseminação clonal. Todas as estirpes deste genótipo com o mesmo padrão mutacional apresentam o mesmo perfil de PFGE estando, assim, todas incluídas no mesmo cluster. As estirpes BLPACR pertencentes ao grupo mutacional I Ib encontram-se todas no cluster 10 ou em clusters adjacentes a este, apresentando um grau de identidade de cerca de 85%. As estirpes BLPACR do grupo I Ic estão incluídas nos perfis 2 e 30, apresentando 100% de identidade entre si.

Num estudo realizado em Espanha por Sevillano e colaboradores também se observou uma maior relação filogenética entre as estirpes BLPACR do que entre as estirpes BLNAR. Tal como é observado neste trabalho, as estirpes BLPACR, por eles estudadas, estão filogeneticamente relacionadas apresentavam o mesmo padrão mutacional (Sevillano *et al.*, 2009).

Estes dados sugerem uma possível disseminação clonal das estirpes BLPACR, tanto no nosso país como em Espanha.

Considerações finais

Em resumo, podemos dizer que, em termos globais, os nossos resultados apresentam padrões mutacionais muito idênticos aos reportados no resto da Europa, Canadá e Japão, havendo diferenças essencialmente na prevalência dos diferentes genótipos. Por exemplo, a amostra estudada sugere uma elevada prevalência de estirpes BLNAR entre as estirpes com CIMs à ampicilina entre 1 e 8 µg/ml, assim como uma elevada prevalência de estirpes BLPACR entre as estirpes produtoras de β -lactamase. Pelo contrário no Japão as estirpes BLPACR são muito pouco comuns, e as estirpes BLNAR estão presentes numa percentagem muito elevada. Este facto pode dever-se à inexistência de vacina Hib, neste país. Nos EUA a realidade é outra. A percentagem de estirpes BLNAR, apesar de ter vindo a aumentar nos últimos anos, é ainda muito baixa, enquanto as estirpes BLPAR, existem numa percentagem elevada, havendo contudo poucos relatos de estirpes BLPACR. Pensamos que estes resultados são indicativos da pouca literatura existente nesta temática, neste país.

No que diz respeito às substituições aminoacídicas identificadas por mutações no gene *ftsI*, os nossos resultados estão de acordo com os estudos efectuados noutros países onde se propõe a existência de uma relação entre as principais mutações descritas e o mecanismo de resistência não enzimático aos antibióticos β -lactâmicos.

H. influenzae BLNAR são definidos como estirpes que apesar de não produzirem β -lactamase apresentam, normalmente, valores de CIM à ampicilina que os classificam como susceptíveis ou intermédios, nos testes de rotina para a determinação da susceptibilidade aos antibióticos. Este trabalho dedicou-se principalmente ao estudo de estirpes com estas características, sugerindo que apenas utilizando técnicas moleculares específicas, nomeadamente amplificação e sequenciação do gene envolvido na resistência à ampicilina e identificação de mutações no referido gene, é possível caracterizar o mecanismo de resistência não enzimático. Estes resultados estão em desacordo com os *breakpoints* estabelecidos à data pelo CLSI. Assim, concordamos com os trabalhos realizados por outros investigadores, que apresentam dados sobre esta temática onde se realça a importância de definir novos *breakpoints* para os antibióticos β -lactâmicos no caso de *H. influenzae* (Alou *et al.*, 2007; García-Cobos *et al.*, 2008b; Shuel e Tsang *et al.*, 2009).

É importante realçar que estas técnicas moleculares também nos permitiram caracterizar *H. influenzae* BLPACR, que apesar de resistentes à ampicilina por produção de β -

lactamase apresentavam, ainda, um outro mecanismo de resistência. A detecção de estirpes com este fenótipo contribuiu para dar mais relevo a esta problemática da resistência aos antibióticos no *H. influenzae*, hoje considerada com maior acuidade a nível mundial. Podemos, assim, afirmar que a compreensão destes mecanismos, a nível genético, poderá levar ao desenvolvimento de novos meios de diagnóstico para a sua detecção.

Apesar destes resultados, face à resistência aos antibióticos hoje em dia pouco se sabe sobre o comportamento destas estirpes *in vivo*. Pensamos, assim, ser de importância major a realização de mais estudos em que seja possível estudar a interacção desta espécie com o hospedeiro, de forma a caracterizar e monitorizar a evolução da resistência nestas estirpes, com vista ao aconselhamento de uma terapia antibiótica empírica eficaz. Falências terapêuticas são frequentemente responsáveis pela emergência da resistência, aumentando a probabilidade de as estirpes se adaptarem adquirindo novos mecanismos de resistência.

Este trabalho, de investigação de carácter fundamental, contribui, assim, para clarificação desta importante problemática, em Saúde Pública, no nosso país.

Bibliografia

Alaedini, A., and Day, R. A. 1999. Identification of two penicillin-binding multienzyme complexes in *Haemophilus influenzae*. Biochemical and Biophysical Research Communications 264: 191-195.

Alou, L., Giménez, M. J., Sevillano, D., Aguilar, L., González, N., Echeverría, O., Torrico, M., Coronel, P. and Prieto, J. 2007. Are β -lactam breakpoints adequate to define non-susceptibility for all *Haemophilus influenzae* resistance phenotypes from a pharmacodynamic point of view. J. Antimicrob. Chemother. 59: 652-657.

Ambler, R.P.1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 289: 321-31.

Arnold C., Makintube, S., Istre, G.R. 1993. Day care attendance and other risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. Am J Epidemiol 138: 333-340.

Atkinson, W., Hamborsky, J., McIntyre, L., Wolfe, S. 2008. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 10th ed. 2nd printing, Centers for Disease Control and Prevention, Washington DC: Public Health Foundation.

Bajanca, M. P., Caniça, M. and Multicenter Study Group. 2004. Emergence of noncapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). J. Clin. Microb. 42: 807-810.

Barateiro, A. P. 2005. Caracterização dos Mecanismos de Resistência aos antibióticos β -Lactâmicos em estirpes de *H. Influenzae*. Tese de Licenciatura Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

Barry, A. L., Fuchs, P. C. And Brown S. D. 2001. Identification of β -lactamase-Negative Ampicillin-Resistant Strains of *Haemophilus influenzae* with Four Methods and Eight Media. Antimicrob Agents Chemother 45(5): 1585-1588.

Barry, A. L., Pfaller, M. A., Fuchs, P. C. 1993. *Haemophilus* test medium versus Mueller-Hinton Broth with lysed horse blood for antimicrobial susceptibility testing of four bacterial species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 12 : 548-553.

Bradford, P. 2001. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 14: 933-951.

Bryan, L. E. and Godfrey, A. J. 1991. Beta-lactams antibiotics: mode of action and bacterial resistance. In: Antibiotics in laboratory medicine (Lorian V editor), 3rd edition, pp 599-664, The Williams & Wilkins Co, Baltimore.

Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A. 1995. A Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39: 1211-1233.

Campos, J., Hernando, M., Román, F., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., Oteo, J., Lázaro, E., de Abajo, F. and the Group of Invasive *Haemophilus* infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain. 2004. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *Haemophilus influenzae* Type b. J of Clinic Microbiol 42: 524-529.

Cerquetti, M., Giufrè, M., Cardines, R. and Mastrantonio P. 2007. First Characterization of Heterogeneous Resistance to Imipenem in Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Isolates. Antimicrob Agents Chemother 51: 3155-3161.

Cerquetti, M., Cardines, R., Giufrè, M. And Mastrantonio, P. 2004. Antimicrobial Susceptibility of *Haemophilus influenzae* strains isolated from invasive disease in Italy. J. Antimicrob Chemother 54: 1139-1143.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. Volume 29 N°3.

Dabernat, H., Delmas, C., Seguy, M., Pelissier, R., Faucon, G., Bennamani, S. and Pasquier, C. 2002. Diversity of β -Lactam Resistance-Confering Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 46: 2208-2218.

Dabernat, H., Plisson-Sauné, M., Delmas, C., Séguy, M., Faucon, G., Pélissier, R., Carsenti, H., Pradier, C., Roussel-Delvallez, M., Leroy, J., Dupont, M., De Bels, F. And

- Dellamonica P.** 2003. *Haemophilus influenzae* Carriage in Children Attending French Day Care Centers: a Molecular Epidemiological Study. *J Clin Microbiol* 41(4): 1664-1672.
- de Lencastre, H., Kristisson, K.G., Brito-Avô, A., Sanches, I.S., Sá-Leão, R., Saldanha, J., Sigvaldadottir, E., Karlsson, S., Oliveira, D., Mato, R., Aires de Sousa, M., Tomasz A.** 1999. Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *Microb Drug Resist* 5: 19-29.
- Demain, A. L., Elander, R. P.** 1999. The β -lactam antibiotics: past, present and future. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 5-19.
- De Wals, P., Erickson, L., Poirier, B., Pépin, J., Pichichero, M. E.** 2009. How to compare the efficacy of conjugate vaccines to prevent acute otitis media? *Vaccine*. 7:2877-2883
- Erwin, A. and Smith, A. L.** 2007. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and comensal behavior. *TRENDS in Microbiology* 15: 355-362.
- Evans, A. S and Brachman, P. S.** 1998. Bacterial infections of humans: epidemiology and control. 3rd edition, Springer.
- Falla, T. J., Crook, D. W., Brophy, L.N., Maskell, D., Kroll, J. S., Moxon, E. R.** 1994. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 32: 2382-2386.
- Farrell, D. J., Morrissey, I., Bakker, S., Buckridge, S. and Felmingham, D.** 2005. Global Distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrobial Chemother* 56:773-776.
- Fluit, AD. C., Visser, M. R. and Schmitz, F.** 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 14: 836-871.
- Forsgren, A., Riesbeck, K., Janson, H.** 2008. Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable *H. influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 46: 726-31.
- García-Cobos, S., Campos, J., Cercenado, E., Román, F., Lázaro, E., Pérez-Vázquez, M., Abajo, F. and Oteo, J.** 2008. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for β -lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community

antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2760-2766.

García-Cobos, S., Campos, J., Román, F., Carrera, C., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B. and Oteo, J. 2008 b. Low β -lactamase negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* Strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (7): 2407-2414.

García-Cobos, S., Campos, J., Lázaro, E., Román, F., Cercenado, E., García-Rey, C., Pérez-Vázquez, M., Oteo, J. and Abajo, F. 2007. Ampicillin-resistant non- β -Lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2564-2573.

Ginsburg, C. M., McCracken, G.H., Rae, S., Parke, J. C. 1977. *Haemophilus influenzae* type b disease: incidence in a day care center. *JAMA* 238: 604-607.

Granoff, D. M., Munson, R.S. 1986. Prospects for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease by immunisation. *J Infect Dis* 153: 448-461.

Groz-Dias, P. 1997. Vacinas anti-hepatite b e anti-*Haemophilus influenzae* tipo b. *Acta Médica Portuguesa* 10: 129-138.

Harimaya, A., Yokota, S., Sato, K., Himi, T. and Fujii, N. 2008. Remarkably high prevalence of *ftsI* gene mutations in *Haemophilus influenzae* isolates from upper respiratory tract infections in children of the Sapporo district, Japan. *J Infect Chemother* 14: 223-227.

Hasegawa, K., Chiba, N., Kobayashi, R., Murayama, S. Y., Iwata, S., Sunakawa, K. and Ubukata, K. 2004. Rapidly increasing prevalence of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1509-1514.

Hotomi, M., Fujihara K., Billal, D. S., Suzuki, K., Nishimura, T., Baba, S. and Yamanaka, N. 2007. Genetic characteristics and clonal dissemination of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3969-3976.

- Hotomi, M., Fujihara K., Sakai, A., Billal, D. S., Shimada, J., Suzumoto, Masaki and Yamanaka N.** 2006. Antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of Japanese children with acute otitis media. *Acta Oto-Laryngologia* 126: 240-247.
- Kaczmarek, F. S., Gootz, T. D., Dib-Haji, F., Shang, W., Hallowell, S. And Cronan, M.** 2004. Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1630-1639.
- Karlowsky, J. A., Verma, G., Zhanel, G. G., Hoban, D. J.** 2000. Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 45: 871-875.
- Kessler, A., Wetmore, R. F., Marsh, R. R.** 1993. Childhood epiglottitis in recent years. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 25 : 155-162.
- Kilian M, Biberstein E.L.** 1984. *Haemophilus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol I. (In Krieg NR, Holt JG editors). Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers, Smith 1917. pp 558-569, The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Kilian, M., Frederiksen, W.** 1981. Ecology of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In : *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*, and of some of their species (Kilian M, Frederiksen W, Biberstein EL editors), pp 11-38, London. Academic Press Inc.
- Kim, I., Ki, C., Kim, S., Oh, W. S., Peck, K. R., Song, J., Lee, K. and Lee, N. Y.** 2007. Diversity of ampicillin resistance genes and antimicrobial susceptibility patterns in *Haemophilus influenzae* strains isolated in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 453-460.
- Kubota, T., Higa, F., Kusano, N., Nakasone, I., Haranaga, S., Tateyama, M., Yamane, N. and Fujita, J.** 2006. Genetic Analyses of Beta-Lactamase Negative Ampicillin-Resistant Strains of *Haemophilus influenzae* Isolated in Okinawa, Japan. *J. Infect Dis* 59: 36-41.
- LaClaire, L. L., Tondella, M. L. C., Beall, D. S., Noble, C. A., Raghunathan, P. L., Rosenstein, N. E., Popovic, T., and the Active Bacterial Core Surveillance Team**

- Members.** 2003. Identification of *Haemophilus influenzae* Serotypes by Standard Slide Agglutination Serotyping and PCR-Based Capsule Typing. J Clin Microb 41(1): 393-396.
- Lavado, M. P.** 1996. Contribuição para o Estudo da Suscetibilidade aos Antibióticos e dos Mecanismos de Resistência em Estirpes de *Haemophilus influenzae* Isoladas em Portugal. Tese de Doutoramento. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Lavado, M. P.** 2009. Caracterização fenotípica e genotípica de *Haemophilus influenzae* isolados em crianças com Otites no período que antecede a vacinação com PCV10-HiD. Acta pediatr Port 40(5): S128
- Liras, P. and Martín, J. F.** 2006. Gene clusters for β -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? Int Microbiol 9: 9-19
- Livrelli, V., Peduzzi, J. and Joly, B.** 1991. Sequence and molecular characterization of the Rob-1 β -lactamase gene from *Pasteurella haemolytica*. Antimicrob Agents Chemother 35(2): 242-251.
- Lorian, V.** 1991. β -lactam antibiotics: Mode of Action and Bacterial Resistance In: Antibiotics in Laboratory Medicine (Williams & Wilkins editors). Third Edition pp: 599-643
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberd O. and Dessen A.** 2006. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. FEMS Microbiol Rev 30: 673-691.
- Matic, V., Bozdogan, B., Jacobs, M. R., Ubukata, K. and Appelbaum, P. C.** 2003. Contribution of β -lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in β -lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 52: 1018-1021.
- Mendelman, P. M., Chaffin, D. O., Stull, T. L., Rubens, C. E., Mack, K. D. And Smith, A.** 1984. Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 26: 235-244.
- Mendelman, P. M., Chaffin, D. O., Musser, J. M., De Groot, R., Serfass, D. A., and Selander, R. K.** 1987. Genetic and phenotypic diversity among ampicillin-resistant non-beta-

lactamase-producing, nontypeable *Hemophilus influenzae* isolates. Infect. Immun. 55: 2585-2589.

Moxon, E.R. 1993. Microbes molecules and man. J Royal Coll Physicians Lond 27: 169-174.

Murphy T.F. 1992. *Haemophilus influenzae* and viruses 100 years later: from *Influenzae* to human immunodeficiency virus. Amer J Med 92: 583-586.

Murray, P. 2002. Pasteurellaceae. In: Medical microbiology (Mosby editor), pp 317-324.

Osaki, Y., Sanbogi, Y., Ishijawa, M., Kataoka, H., Suzuki, T., Maeda, K. and Ida, T. 2005. Genetic Approach To Study the Relationship between Penicillin-Binding Protein 3 Mutations and *Haemophilus influenzae* β -lactam Resistance by Using Site-Directed Mutagenesis and Gene Recombinants. Antimicrob Agents Chemother 49(7): 2834-2839.

Peake, R., James, D., Susman, M., Kennedy, C., Singleton, M., and Schuenke, S. 1996. Medical Microbiology, Galveston.

Peltola, H., Kayhty, H., Sivonen, A., and Makela, P.H. 1977. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double blind field study of 100000 vaccines 3 months to 5 years of age in Finland. Pediatrics 60: 730-737.

Pelton, S. I. 2007. Prospects for prevention of otitis media. Pediat Infect Dis J 26: S20-S22

Prymula, R., Peeters, P., Chrobok, V., Kriz, P., Novakova, E., Kaliskova, E., Kohl, I., Lommel, P., Poolman, J., Prieels, J., and Schuerman, L. 2006. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. Lancet 367: 740-748.

Rosário N. A. e Grumach, A. S. 2006. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. J. Pediatr 82: S181-S188.

Rubin, L. G., Yolken, R. H., Medeiros, A. A., and Moxon, E. R. 1981. Ampicillin treatment failure apparently beta-lactamase-negative *H. influenzae* type b meningitis due to novel beta-lactamase. Lancet 8254: 1008-1010.

- Sanbongi, Y., Suzuki, T., Osaki, Y., Senju, N., Ida, T. and Ubukata, K.** 2006. Molecular evolution of β -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2487-2492.
- Satola, S. W., Schirmer, P. And Farley, M. M.** 2003. Complete sequence of the *cap* locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. *Infection and Immunity*. 71: 3639-3644.
- Satola, S. W., Schirmer, P. L. and Farley, M. M.** 2003b. Genetic Analysis of the Capsule Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype f. *Infection and Immunity*. 71(12): 7202-7207.
- Sauders, J. R., Elwell, L. P., Falkow, S., Sykes, R. B., and. Richmond, M. H.** 1978. Beta-lactamases and R-plasmids of *Haemophilus influenzae*. *Scand J Infect Dis Suppl* 16-22.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. and Charlier, P.** 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32: 234-258.
- Sevillano, D., Giménez, M., Cercenado, E., Cafini, F., Gené, A., Alou, L., Marco, F., Martínez-Martínez, L., Coronel, P. and Aguilar, L.** 2009. Genotypic versus Phenotypic Characterization, with Respect to β -lactam Susceptibility, of *Haemophilus influenzae* Isolates Exhibiting Decreased Susceptibility to β -lactam Resistance Markers. *Antimicrob Agents Chemother* 53(1): 267-270.
- Shuel, M. L. and Tsang R. S. W.** 2009. Canadian β -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* isolates showing decreased susceptibility toward ampicillin have significant penicillin binding protein 3 mutations. *Diagnost Microbiol and Infect Dis* 63: 379-383.
- Shungu, D.L.** 1991. Chemical and physical properties of antibiotics: preparation and control of antibiotic susceptibility disks and other devices containing antibiotics. In: *Antibiotics in laboratory medicine* (V. Lorian editor), pp 787, Baltimore, USA.
- Sousa, J. C., Peixe, L. V., Ferreira, H., Pinto, M. E., Nascimento, M. S. J., Sousa, M. I., Cabral, M.** 1998. Antimicrobianos. In: *Microbiologia volume 1* (W. F. C. Ferreira e J. C. Sousa eds), pp 239-269, Lidel, Lisboa.

- Sousa, J. C. e Prista, L.V.** 1988. Antibióticos inibidores de biossíntese do peptidoglicano. Ordem dos farmacêuticos, Porto.
- Sunakawa, K. and Farrel, D.** 2007. Mechanisms, molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. *Annals of Clinical Microbiol and Antimicrob*6:7.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. And Swaminathan, B.** 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin Microb* 33(9): 2233-2239.
- Tristam, S. G., Jacobs, M.R., Appelbaum, P. C.** 2007. Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinic Microbiol Rev* 20: 368-389.
- Tristam, S. G., Hawas, R. and Souprounov, J.** 2005. Variation in selected regions of *bla*_{TEM} genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 56: 481-484.
- Todar, K.** 2008. Online Textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin.
- Turk, D. C.** 1984. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* 18: 1-16.
- Turk, D. C., May, J.R.** 1967. *Haemophilus influenzae*: it's clinical importance. English Universities Press, pp 1-134, London.
- Ubukata, K., Chiba, N., Hasegawa, K., Shibasaki, Y., Sunakawa, K., Nonoyama, M., Iwata, S. and Konno M.** 2002. Differentiation of β -lactamase-negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by disc method. *J infect Chemother* 8:50-58.
- Ubukata, K., Shibasaki, Y., Yamamoto, K., Chiba, N., Hasegawa, K., Takeuchi, Y., Sunakawa, K., Inoue, M. and Konno, M.** 2001. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -Lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1693-1699.
- Vaz Pato, M. V.** 1989. Susceptibilidade aos antibióticos. bioMérieux, Portugal.

- Vega, R., Sadoff, H. L., Patterson M. J.** 1976. Mechanisms of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* type b. 9: 164-168.
- Wilke, M. S., Lovering, A. L. and Strynadka, N.** 2005. β -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8: 525-533.
- Wissel, M. C., Weiss, D. S.** 2004. Genetic analysis of the cell division protein FtsI (PBP3): amino acid substitutions that impair septal localization of *FtsI* and recruitment of FtsN. *J of Bacteriology* 186: 490-502.
- Zinnemann K.** 1981. Ecology of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In: *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus, and of some of their species* (Kilian M, Frederiksen W, Biberstein EL editors) pp 1-10, Academic Press Inc, London.

Anexos

Anexo I

Primers	Sequência nucleotídica	PCR
Cap Hi1	5' CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GAC 3'	Pesquisa do gene <i>cap</i>
Cap Hi2	5' TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G 3'	Pesquisa do gene <i>cap</i>
Cap Hia1	5' CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC 3'	Caracterização do serótipo a
Cap Hia2	5' GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG 3'	Caracterização do serótipo a
Cap Hib1	5' GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC 3'	Caracterização do serótipo b
Cap Hib2	5' GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA 3'	Caracterização do serótipo b
Cap Hic1	5' TCT GTG TAG ATG ATG GTT CA 3'	Caracterização do serótipo c
Cap Hic2	5' CAG AGG CAA GCT ATT AGT GA 3'	Caracterização do serótipo c
Cap Hid1	5' TGA TGA CCG ATA CAA CCT GT 3'	Caracterização do serótipo d
Cap Hid2	5' TCC ACT CTT CAA ACC ATT CT 3'	Caracterização do serótipo d
Cap Hie1	5' GGT AAC GAA TGT AGT GGT AG 3'	Caracterização do serótipo e
Cap Hie2	5' GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG 3'	Caracterização do serótipo e
Cap Hif1	5' GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC 3'	Caracterização do serótipo f
Cap Hif2	5' CGC AAT TAT GGA AGA AAG CT 3'	Caracterização do serótipo f
FIN	5' ATT CTT GAA GAC GAA AGG GC 3'	Detecção do gene <i>bla_{TEM}</i>
DEB	5' ATG AGT AAA CTT GGT CTG AC 3'	Detecção do gene <i>bla_{TEM}</i>
P1	5' TAC GAT AGC GGA GGG CTT AC 3'	Detecção do gene <i>bla_{TEM}</i>
P2	5' TTC CTG TTT TTG CTC ACC AC 3'	Detecção do gene <i>bla_{TEM}</i>
ROBr	5' GGG CAA TCG TCA TGC CTT TG 3'	Detecção do gene <i>bla_{ROB}</i>
ROBs	5' AAG CCC GCA TTG GCG TTT AT 3'	Detecção do gene <i>bla_{ROB}</i>
ftsI frw	5' GAC GAT TTG GAT AAC CCA TA 3'	Detecção do gene <i>ftsI</i>
ftsI rev	5' CTG GAT AAT TCT GTC TCA GA 3'	Detecção do gene <i>ftsI</i> ; Sequenciação
ftsI lin rev	5' TAG AAA GCG GGC GAT AAA CAC C 3'	Sequenciação gene <i>ftsI</i>
P6 frw	5' ACG ATG CTG CAG GCA ATG GT 3'	Identificação <i>H. influenzae</i>
P6 rev	5' CATCAGTATTACCTTCTACTAAT 3'	Identificação <i>H. influenzae</i>

Tabela 1- Descrição dos *primers* específicos utilizados ao longo deste trabalho.

Anexo II

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina ou Glicocola	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butiário
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropionico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butiário

Tabela 2- Nomenclatura dos aminoácidos essenciais com os respectivos símbolos e abreviaturas.

Anexo III

Hospitais que integram o Grupo de Estudo Multicêntrico de Vigilância da Susceptibilidade aos Antibióticos (GEMVSA) onde foram isoladas as estirpes utilizadas neste estudo:

Zona Norte

Hospital Maria Pia, Porto (**HMP**)

Hospital Geral de Santo António, Porto (**HSA**)

Hospital de Vila Nova de Gaia

Instituto Nacional de Saúde, Porto (**INSAP**)

Hospital de Viseu (**HViseu**)

Zona Centro

Centro Hospitalar de Coimbra (**CHC**)

Zona Sul

Hospital de Conde Castro Guimarães, Cascais

Hospital Fernando da Fonseca, Lisboa (**HFF**)

Hospital Garcia da Orta, Lisboa (**HGO**)

SAMS, Lisboa

Hospital São Francisco Xavier, Lisboa (**HSFX**)

Hospital de São José, Lisboa (**HSJosé**)

Hospital de Santa Maria, Lisboa (**HSM**)

Hospital do Barreiro (**HBarreiro**)

Hospital da CUF Descobertas, Lisboa (**HCUF**)